

タクロリムス軟膏の安全な使用を志向した
皮膚状態が異なる部位に適用した場合の
全身および皮膚局所移行動態の解析

間 祐太朗

目次

総論の部

緒言	・ ・ ・ ・ 1
----	-----------

第 1 章 タクロリムス全身移行動態に及ぼす種々皮膚生理状態の影響 に関するヘアレスラットを用いた検討	・ ・ ・ ・ 4
--	-----------

第 1 節 角層バリア能とタクロリムス全身移行性の関係	・ ・ ・ ・ 5
-----------------------------	-----------

第 1 項 正常な角層バリア能を有する皮膚におけるタクロリムス 全身移行の評価	・ ・ ・ ・ 6
--	-----------

第 2 項 角層バリア障害を有する皮膚におけるタクロリムス全身 移行の評価	・ ・ ・ ・ 8
--	-----------

第 2 節 角層除去皮膚におけるタクロリムス全身移行性に及ぼす軟 膏の塗布面積および軟膏中タクロリムス濃度の影響	・ ・ ・ ・ 10
---	------------

第 3 節 角層除去皮膚におけるタクロリムス全身移行性に及ぼす皮 膚内の種々状態変化の影響	・ ・ ・ ・ 14
--	------------

第 1 項 皮内浮腫を有する皮膚における軟膏適用後のタクロリ ムスの全身移行	・ ・ ・ ・ 15
---	------------

第 2 項 血管収縮剤皮下投与皮膚における軟膏適用後のタクロリ ムスの全身移行	・ ・ ・ ・ 17
--	------------

第 3 項 血管収縮剤併用皮膚適用によるタクロリムス全身移行の 抑制効果	・ ・ ・ ・ 20
---	------------

第 4 節 小括	・ ・ ・ ・ 27
----------	------------

第 2 章 タクロリムスの全身および皮膚局所動態に及ぼす血管外漏出 タンパク質の影響に関する検討	・ ・ ・ ・ 30
---	------------

第 1 節 タクロリムス希釈軟膏適用時における皮内浮腫のタクロリ ムス全身移行動態への影響	・ ・ ・ ・ 31
--	------------

第 2 節 タクロリムス低用量時における皮内浮腫とタクロリムス皮 膚局所移行動態の関係	・ ・ ・ ・ 34
--	------------

第 3 節 小括	・ ・ ・ ・ 36
----------	------------

第 3 章 アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける軟膏適用後のタクロ リムスの全身移行および皮膚中濃度に関する検討	・ ・ ・ ・ 37
第 1 節 アトピー性皮膚炎モデルマウスにおけるタクロリムス全身 移行性の評価	・ ・ ・ ・ 38
第 2 節 タクロリムスの全身移行の制御を目的とした希釈軟膏の適 用	・ ・ ・ ・ 42
第 3 節 より安全なタクロリムス軟膏の使用を志向した血管収縮剤 併用皮膚適用の効果の検証	・ ・ ・ ・ 47
第 4 節 小括	・ ・ ・ ・ 56
結論	・ ・ ・ ・ 57
謝辞	・ ・ ・ ・ 60
実験の部	・ ・ ・ ・ 61
第 1 章 実験の部	・ ・ ・ ・ 61
第 2 章 実験の部	・ ・ ・ ・ 66
第 3 章 実験の部	・ ・ ・ ・ 67
統計処理	・ ・ ・ ・ 70
引用文献	・ ・ ・ ・ 71

総論の部

緒言

アトピー性皮膚炎 (AD) は湿疹を主病変とする慢性炎症性皮膚疾患である。強い瘙痒を伴い増悪と寛解を繰り返すのが特徴である¹。近年、乳幼児のみならず、青年期および成人患者の増加が社会問題化し²、AD の罹患率は世界規模で上昇している^{3,4}。

免疫抑制剤であるタクロリムス (TL) は、臓器移植における拒絶反応の抑制に広く使われている。さらに、皮膚に存在する免疫担当細胞にも有効であることから⁵⁻⁷、TL の軟膏剤が AD の治療薬として使用されている。AD に対する TL の抗炎症作用の強さは、成人用の 0.1% TL 含有軟膏でステロイド外用薬のストロング、小児用 0.03% TL 含有軟膏でミディアムと同等とされており、短期および長期的な有効性は小児から成人まで広く証明されている⁸⁻¹²。局所有害作用に関しては、多くの患者で軟膏の適用部に一過性の熱感や搔痒感を生じることが報告されている¹³。ただし、いずれの出現率も、TL 軟膏の塗布開始数日後に低下し、皮疹の改善とともに発現しなくなる^{12,14,15}。さらに、ステロイド外用薬の長期連用で見られる皮膚萎縮や血管拡張作用を生じない¹⁶。以上の通り、臨床使用での TL 軟膏の成人および小児における有効性や短期的な局所有害事象などの安全性に関するエビデンスが集積されてきた。

AD 治療における TL 軟膏の高い有用性が認められる一方で、TL 軟膏の長期使用における安全性について長らく議論がされている。プロトピック軟膏の非臨床試験のうち、マウス塗布がん原性試験において、プロトピック軟膏 0.03% および 0.1% をマウスの全体表面積の 40% に相当する塗布面積で 2 年間塗布した結果、0.1% 群で高い血中 TL 濃度の持続に基づく内臓のリンパ腫の増加が認められた¹⁷。また、Hui らが報告した後ろ向きコホート研究において、AD 患者の TL 軟膏使用例で皮膚 T 細胞リンパ腫の発現リスクの上昇が確認された¹⁸。その一方で、TL 軟膏を使用する患者のリンパ腫の発生頻度は自然発生率を超えるものでなく、TL 軟膏の使用がリンパ腫のリスク増大の要因とは考えられないといった報告も散見される¹⁹⁻²¹。AD 患者を対象にした TL 軟膏皮膚適用後の薬物動態学試験では、TL の全身循環への移行が確認されてい

る²²⁻²⁶。その多くで 1 ng/mL 以下と低い血中 TL 濃度（臓器移植に適用される際の目標とするトラフ値: 5.0-20 ng/mL）を示しており、TL の血中への移行性は極めて低いことが明らかにされた。しかしながら、AD では、疾患の性質上、TL 軟膏を長期的に使用するため、慢性使用に伴う全身性副作用の発現が懸念される。

TL の分子量は約 822（TL 水和物として）である。そのため、TL は正常な皮膚を浸透しにくい、AD 患者の約 80%に皮膚のバリア能に異常があるため^{27,28}、TL は皮膚に浸透し易くなる^{22,29}。そして、皮膚に浸透した TL は表皮ランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞などの免疫担当細胞に作用することで^{6,7}、皮膚局所で薬効を発揮する。皮膚中を拡散する TL は、皮膚真皮以下に存在する血管から取り込まれ、全身循環へと移行する。しかしながら、TL の全身への移行は、全身性副作用の観点から望ましくない。

皮膚に適用される製剤は 2 つに大別される。それぞれ、皮膚真皮層にある血管から取り込まれて全身循環へ移行することで全身性の効果が期待される全身作用型製剤（transdermal drug delivery systems (TDDSs)）と、皮膚局所もしくは皮下の筋骨格系に作用して効果を発揮する局所作用型製剤である。これら皮膚適用製剤は、特に TDDSs においては、一般的に正常皮膚に適用される。そのため、薬物の経皮吸収試験には、損傷皮膚でなく、その多くで正常皮膚が使用される。しかしながら、*in vitro* 皮膚透過試験において、皮膚の損傷により薬物透過性の変化が確認されている³⁰⁻³²。ウサギ摘出耳介灌流法を用いた *in vitro* 皮膚透過試験では、血管内にブラジキニンとウシ血清アルブミンを含有したタイロード液を灌流させると、ブラジキニンによる血管拡張とそれに伴うウシ血清アルブミンの血管外漏出により、皮膚に適用された薬物の分布が変動した³³。さらに、皮膚内部に炎症を有するラットや血管モデルを組み込んだ人工膜積層皮膚モデルでの経皮吸収試験において、薬物の全身および局所移行性が、適用される皮膚（もしくは積層膜間）の生理状態に影響を受けることが報告されている³⁴。

TL 軟膏の適用部位となる AD 患者の皮膚では炎症反応が生じている。例えば、角層バリア能の障害や血流量の変化、血管透過性の亢進とそれに伴う血漿成分の血管外漏出など様々な変化が生じている³⁵⁻³⁸。そして、この多様な変化が TL の全身および局所移行動態に影響を及ぼすことが予想される。しかしながら、皮膚生理状態の変化が、TL の全身および皮膚局所移行性にどのような影響を及ぼすのか詳細に検討した報告はない。

そこで、複合事象に位置付けられる皮膚生理状態の変化を素過程に分離し、TL の全身移行動態および皮膚局所動態に及ぼす影響の評価と、その要因を明らかにすることを目的として研究を開始した。すなわち、AD 患者の皮膚で観察される炎症に伴う皮膚生理状態の変化である①角層バリア能の障害、② 皮膚血流量の変化、③ 血管透過性の亢進、④ 血管透過性亢進に伴う血漿タンパク質の血管外漏出に着目し、それら皮膚状態の変化と TL 全身移行動態および皮膚局所動態との関係を、全血中および皮膚中 TL 濃度を測定することで評価した。その際、経皮水分蒸散量 (transepidermal water loss (TEWL)) および皮膚血流量を、皮膚生理状態の定量化に用いた。

第 1 章では、ヘアレスラット背部皮膚を使用し、種々皮膚生理状態の変化を人工的に引き起こしたモデル、すなわちテープストリッピングにより角層を完全にもしくは一部除去した皮膚モデルや皮膚内に起炎剤を投与した皮膚モデル、血管収縮剤の投与により血流を低下させた皮膚モデルを作成し、それら皮膚モデルで観察される皮膚生理状態の変化と TL 全身移行動態の関係を評価した。そして、TL の全身性副作用予防の観点から、皮膚の状態変化に応じた TL 軟膏の適用方法に関するフローチャートを作成した。第 2 章では、皮膚の真皮にある毛細血管から漏出した血漿成分に着目し、TL の皮膚局所動態との関係について検討を行った。すなわち、ヘアレスラット背部皮膚に浮腫を生じさせ、TL の全身移行動態と薬効に関わると考えられる皮膚中 TL 濃度への影響を評価した。第 3 章ではアトピー様皮膚病変を呈する AD モデルマウスを用いて、軟膏適用後の TL の全血中および皮膚中濃度を測定し、第 1 章および第 2 章の結果をもとに、実際の AD 患者で起こり得る TL の全身および局所移行動態の変化とその要因を考察した。さらに、TL の全身移行の回避を目的に、皮膚状態に応じて TL 軟膏の適用法を変更し、その有用性を評価した。

第 1 章 タクロリムス全身移行動態に及ぼす種々皮膚生理状態の影響に関するヘアレスラットを用いた検討

薬物の皮膚透過性もしくは皮膚からの全身移行性は、皮膚の構造やその状態により影響を受ける。TL 軟膏が適用される部位は、炎症皮膚であり、その皮膚病変は寛解と増悪を繰り返しながら慢性的に経過するため、皮膚の状態変化は複雑となる。そこで、本章では、ヘアレスラットを用いて特徴的な皮膚の状態変化をきたしたモデル皮膚を作成した。テープストリッピング処理により角層バリア能を変化させた皮膚や起炎剤の皮膚内投与により急性炎症を生じた皮膚、さらには血管収縮剤投与により皮膚血流量を変化させた皮膚を用いて、*in vivo* 経皮吸収試験を行った。各種皮膚の生理状態として角層バリア能と皮膚血流量を定量的に評価するために、皮膚からの水分蒸散量を示す TEWL^{39,40} および血球運動の測定により得られる perfusion units (PU, arbitrary units)^{41,42} を用いた。それら皮膚生理パラメーターと全血中 TL 濃度の測定により、TL の全身移行動態に影響を及ぼす要因を調査した。

第 1 節 角層バリア能とタクロリムス全身移行性の関係

一般的に、薬物の経皮吸収の律速段階は角層の透過過程となる。TL においても同様に、角層の透過抵抗が経皮吸収の最大の障壁と考えられる。TL 軟膏を投与した AD 患者で皮膚病変の寛解に伴い、TL の血中濃度が低下したという報告がある²⁴。しかしながら、皮膚病変の寛解は、角層バリア能の改善だけでなく、皮内環境の正常化によるとも考えられる。TL 全身移行動態に角層バリア能と皮内環境のどちらの影響が大きく寄与するのか、もしくは協奏的に寄与するかについては明らかでない。そこで、第 1 節では角層バリア能に着目し、TL の全身移行性との関係を検討した。第 1 項ではヘアレスラット正常皮膚における TL の全身移行性を評価した。さらに、健全な角層バリア能を有する皮膚に対して起炎剤を投与することで皮内局所に急性炎症を惹起させ、それにより TL の全身移行が変化するかを評価した。また、TL の全身移行量と角層バリア能の関係を定量的に評価した報告はない。そこで、第 2 項では、TEWL を指標として TL 軟膏適用部位の角層バリア能を定量的に評価し、角層バリア能と TL 全身移行性の関係を調査した。

第 1 項 正常な角層バリア能を有する皮膚におけるタクロリムス全身移行の評価

TL の経皮吸収試験に先立ち、予備検討として、ヘアレスラットの背部皮内に急性炎症を惹起させる手法の確立を行った。すなわち、 λ -カラゲニン、ザイモサン、カゼインからなる起炎物質混合溶液（起炎剤, proinflammatory material solution (PMS)) を皮内に投与することで、皮膚内部に炎症が惹起されるか確認した⁴³。ウレタン腹腔内麻酔下のヘアレスラットにエバンスブルー (EB) を静脈内投与した後、ラットの背部正常皮膚に起炎剤 50 μ L を皮内投与し、その 30 分後に皮膚を摘出した。摘出皮膚の真皮側の写真を Fig. 1 に示す。EB は血漿タンパク質であるアルブミンと高いアフィニティを有するため、血漿タンパク質の血管外漏出マーカーとして多くの研究で使用されている^{44,45}。皮膚組織中への EB の漏出が確認されことから (Fig. 1)、起炎剤の皮内投与による炎症が惹起され、血管透過性亢進に伴う血漿タンパク質の血管外滲出が生じることで、皮膚内部に浮腫が形成されたと考えられた。



Fig. 1 Observation of EB leakage into skin tissue 30 min following an injection of the PMS.

An EB saline solution (1.0%) was injected (1.0 mL) intravenously, and a PMS of λ -carrageenan (0.5%), zymosan (1.0%), and casein (1.0%) was injected intracutaneously 5 min following the EB administration. The treated skin was excised 30 min following the EB administration.

TL 皮膚適用に際して、正常皮膚および起炎剤投与皮膚の生理状態を評価するために TEWL および PU を測定した。その後に、正常皮膚および起炎剤投与皮膚に 0.1^w/_w% TL 軟膏を密封塗布（軟膏適用面積 10 cm²、軟膏適用量 10 mg/cm²）し、TL 全身移行動態を評価した。軟膏適用前の TEWL および PU 値、そして、軟膏適用 15 分、90 分および 8 時間後の全血中 TL 濃度を Table 1 に示す。

Table 1 Physiological skin conditions and TL systemic absorption following the application of 0.1^w/_w% TL ointment through rat skin (10 cm²) with (+) or without (-) the PMS injections.

PMS	Rat #	TEWL (g/m ² /h)	PU	TL whole blood concentration (ng/mL)		
				15 min	90 min	8 h
(-)	1	6.1	130	-*	-	0.07
	2	6.0	123	-	-	-
	3	6.1	166	-	-	-
	4	6.8	187	-	0.14	0.11
	5	7.9	114	-	0.12	0.12
	6	7.2	187	-	0.09	-
Mean ± SD		6.7 ± 0.8	151 ± 33			
(+))	1	5.7	137	-	-	0.07
	2	5.2	134	-	-	-
	3	9.2	70	-	-	-
	4	6.3	161	-	-	0.06
	5	6.3	154	-	0.10	0.10
	6	7.6	222	-	0.13	0.13
Mean ± SD		6.7 ± 1.5	146 ± 49			

* -: Not detected, limit of quantitation: 0.06 ng/mL

PMS = prophlogistic material solution; TEWL = transepidermal water loss; PU = perfusion unit; TL = tacrolimus; SD = standard deviation

正常皮膚の TEWL および PU 値は、個体間で大きな変動は見られなかった。全血中 TL 濃度は、50% (6 匹中 3 匹) の個体でのみ検出された。血中濃度が検出された個体で何れの値も 1 ng/mL 未満であり、非常に低い値であったことから、角層バリア能が正常な皮膚では TL の全身への移行は起こりにくいことが確認された。

起炎剤投与皮膚の TEWL および PU 値はともに個体間でわずかに変動したものの、正常皮膚と比べて有意な変化は観察されなかった。全血中 TL 濃度は、67% (6 匹中 4 匹) で検出されたが、何れも正常皮膚と同様に低い値であった。これらのことから、角層バリアが正常に機能している場合、炎症による皮膚内部の状態変化は、TL の全身移行に影響を及ぼさないと考えられた。

第 2 項 角層バリア障害を有する皮膚におけるタクロリムス全身移行の評価

第 1 項では、角層バリアが正常に機能する皮膚に対して TL 軟膏を適用した場合、TL は血中へ移行しにくいことが示された。AD 患者の皮膚の角層バリア能は、健常人の皮膚に比べて低下しており、その障害の程度は様々である^{36,37,46}。そこで、ラット背部皮膚にテープストリッピング処理を行い、その回数を変えることで角層バリア能の障害の程度が異なる皮膚モデルを作成した。テープストリッピング処理 5、10、11、13、15 回の何れかを行った皮膚をストリッピング処理調整皮膚 (skin treated with controlled stripping)、20 回のストリッピング処理皮膚を角層除去皮膚 (fully stripped skin) とした⁴⁷。ストリッピング処理調整皮膚および角層除去皮膚の軟膏適用部位の TEWL および PU を測定した後、0.1^{w/w}% TL 軟膏を密封塗布 (軟膏適用面積 5.0 cm², 軟膏適用量 10 mg/cm²) し、TL 全身移行動態を評価した。Fig. 2 に、TEWL と試験 8 時間の全血中 TL 濃度曲線下面積 AUC_{blood} の関係をラット個々のデータで示す。

TEWL の上昇に伴い、すなわち角層バリア能の低下に伴って TL の全身移行量の増大が観察された (Fig. 2)。両者の間には正の相関関係があることが明らかとなった (ピアソンの積率相関係数 $r = 0.939$, $P < 0.0001$)。

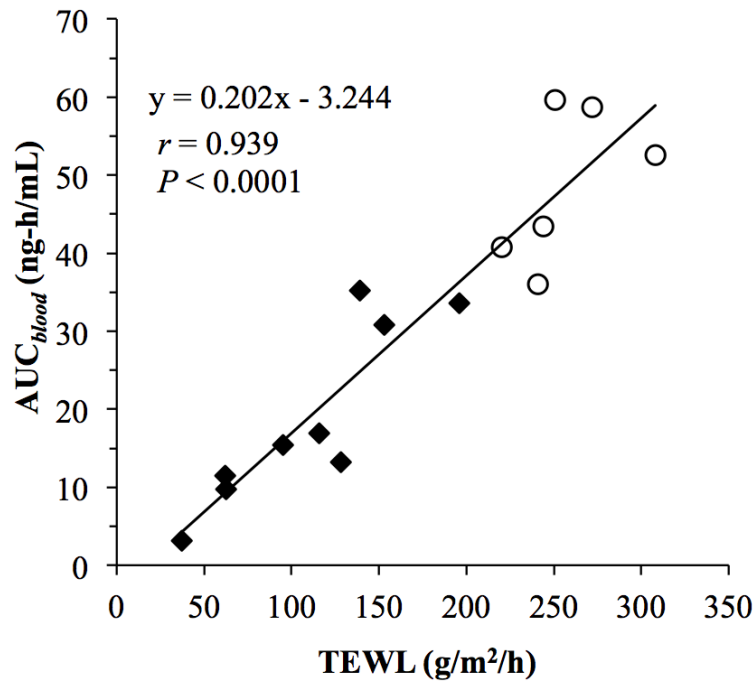


Fig. 2 Relationship between skin barrier function and TL absorption following application of 0.1^{w/w}% TL ointment on rat skin (5.0 cm²).

TEWL was measured in the skin treated with full-stripping (○, n = 6) or controlled stripping (◆, n = 9) prior to TL application. The regression curve: ($AUC_{blood} = (0.202 \times TEWL) - 3.244$). The r and P values were calculated using the Pearson test.

第 2 節 角層除去皮膚におけるタクロリムス全身移行性に及ぼす 軟膏の塗布面積および軟膏中タクロリムス濃度の影響

AD の皮膚病変の面積は患者によって異なり、TL 軟膏の適用面積の増大に伴って TL の血中濃度が上昇する傾向にあるといったことが報告されている^{24,48}。第 1 節において角層バリア能に依存した TL の全身移行が観察されたことから、AD 患者の皮膚病変部における TEWL の測定とその TEWL に合わせた TL 軟膏の希釈により軟膏中 TL 濃度を調整することで、TL 全身移行の制御が見込まれる。これらのことから、適用する TL 軟膏の面積や濃度の選択は大変重要である。

一般的に、皮膚に適用される薬物は、濃度勾配を駆動力とする受動拡散に基づいて皮膚中を移動する。皮膚中のいずれの位置においてもその濃度勾配が一定、すなわち薬物の移動速度が定常状態である場合、経皮吸収速度は (1) 式によって示される。(1) 式中の P は、薬物が皮膚中を移行する線速度 (透過係数) を表し、透過抵抗の逆数であるため、皮膚状態に起因する係数である。 P が一定の条件でも、適用面積 (A) および適用薬物濃度 (ΔC) が変わることによって、経皮吸収速度が変動する。また、投与薬物の体内動態が線形性を示すならば、薬物投与後の定常状態における血中濃度 (C_{ss}) は薬物の投与速度によって決定され、(2) 式によって示される。

$$dx/dt = P \times A \times \Delta C \quad \dots (1)$$

$$C_{ss} = (dx/dt) / CL_{tot} \quad \dots (2)$$

$$C_{ss} = P / CL_{tot} \times A \times \Delta C \quad \dots (3)$$

そして、薬物の皮膚透過速度が全身循環への吸収速度と等しい場合、(3) 式に示されるように、適用面積 (A) および適用薬物濃度 (ΔC) を適切に管理することによって、薬物経皮適用後の血中濃度の制御が可能となる。

そこで、本節ではヘアレスラットの角層除去皮膚において、TL の全身移行性に及ぼす軟膏の適用条件の影響を調査した。すなわち、適用軟膏中 TL 濃度および軟膏の適用面積を変えた際のラット背部皮膚からの TL 全身移行性を評価した。軟膏の希釈には、TL 軟膏の市販製剤の基剤に使用されている流動パラフィンを用いた。角層除去皮膚に適

用した軟膏中 TL 濃度は、市販製剤である成人用の 0.1%と小児用の 0.03%、そして 0.1%軟膏から希釈した 0.003%とした。軟膏の適用面積は、10、5.0 および 0.79 cm²とした。Fig. 3A に、TL 軟膏の密封塗布 8 時間後までの全血中 TL 濃度推移を示す。Fig. 3B および C に、軟膏中 TL 濃度または軟膏適用面積と、各条件下における軟膏適用後の血中濃度推移から算出した AUC_{blood} との関係を示す。

TL の血中濃度は、軟膏中 TL 濃度または適用面積の増加に伴って高く推移した (Fig. 3A)。さらに、TL の全身移行量は、適用軟膏中 TL 濃度および適用面積と比例関係にあることが観察された (Fig. 3B, C)。そのため、(3) 式で示したように、TL は基本的な拡散理論に従って血中に移行することから、TL 軟膏の適用条件を適切に設定することで TL 血中濃度の制御が可能となることが示された。

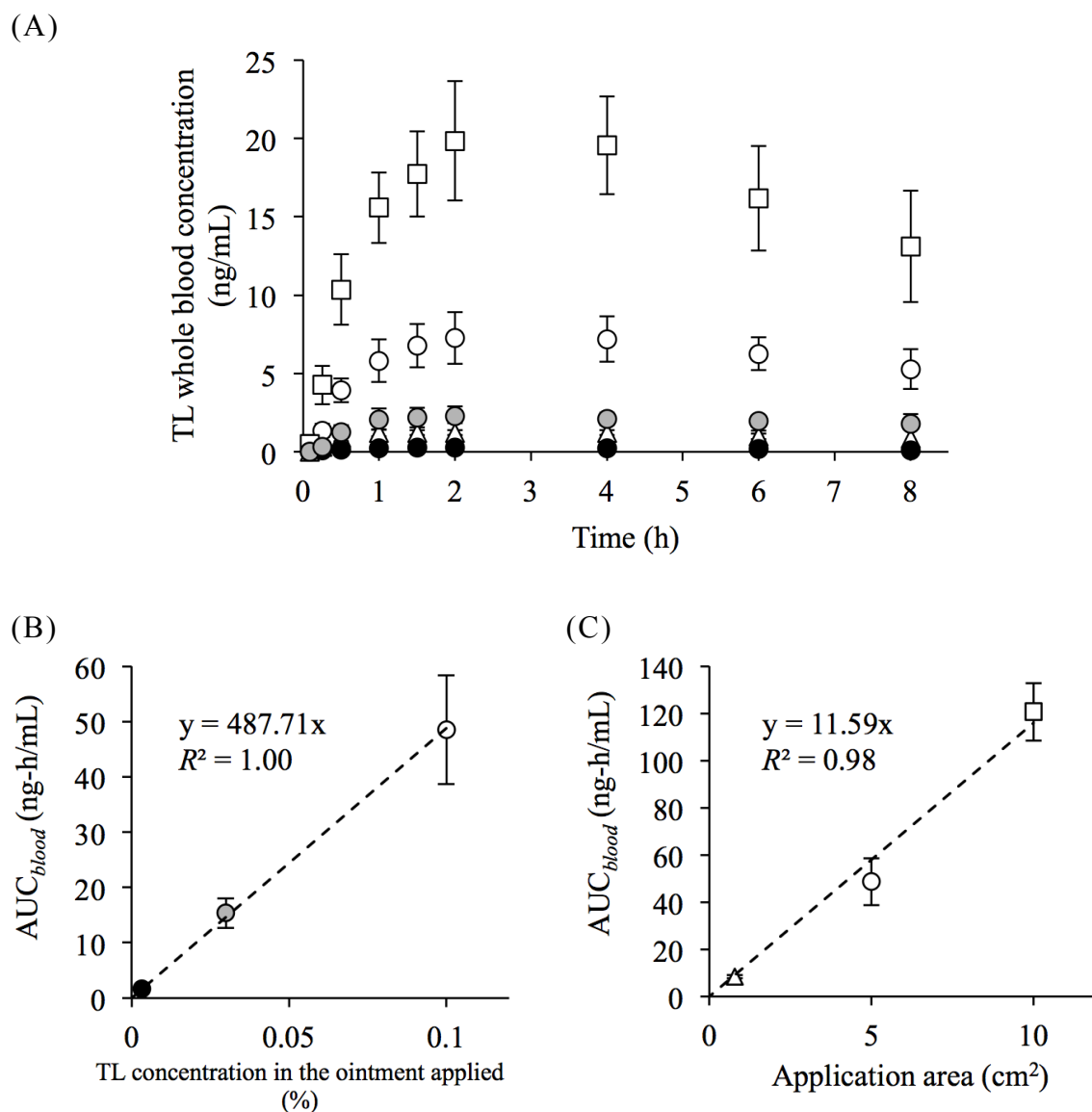


Fig. 3 TL whole blood concentrations following application of TL ointment on fully stripped rat skin with various TL concentrations and application areas (A); relationship between TL absorption and TL concentration in ointment without changing application area of 5.0 cm² (B); relationship between TL absorption and application area without changing an ointment TL concentration of 0.1^w/% (C).

Symbols: □ - 0.1%, 10 cm²; ○ - 0.1%, 5 cm²; ● - 0.03%, 5 cm²; △ - 0.1%, 0.79 cm²; ● - 0.003%, 5 cm². Each value is expressed as mean ± SD (n = 3-6).

第1節 Fig. 2 より、TEWL と TL 全身移行量は、同一 TL 濃度および同一適用面積において正の相関関係にあった。この関係が軟膏の異なる適用条件下でも同様に成立するかを検証するため、角層除去皮膚とストリッピング処理調整皮膚において、軟膏の異なる塗布条件下での *in vivo* 皮膚適用試験の結果を統合して Fig. 4 に示す。各データ間で軟膏中 TL 濃度および軟膏の塗布面積が異なるため、 AUC_{blood} は TL 投与量、もしくは軟膏中 TL 濃度および軟膏の適用面積で標準化した。また、図中にある直線および破線は、それぞれ Fig. 2 の全データの回帰直線およびその 95% 信頼区間を表す。

その結果、軟膏の適用条件を変更した場合も、TEWL と TL 全身移行量の関係は Fig. 2 の結果と良く一致した。しかしながら、角層除去皮膚においては、回帰直線からデータが大きくずれる傾向も見られた。

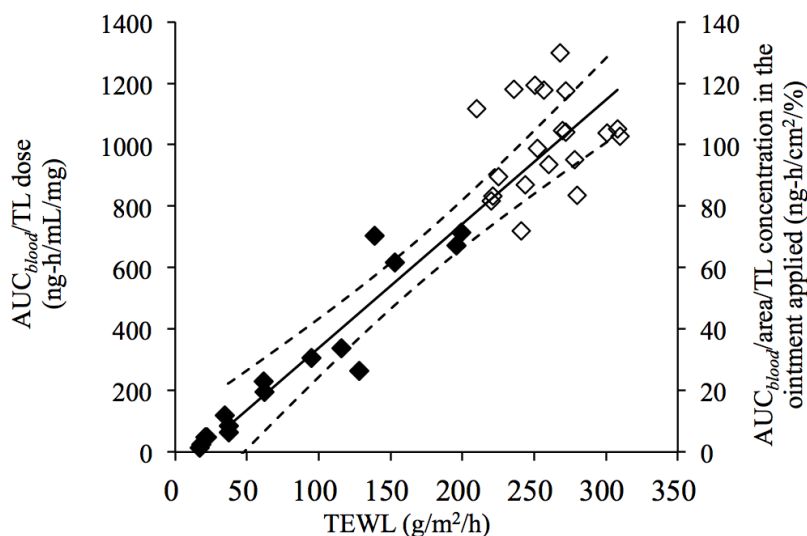


Fig. 4 Relationship between skin barrier function and TL systemic absorption through rat skin following TL application with varied TL concentrations in the ointment applied and application areas.

TEWL was measured in the skin treated with full-stripping (\diamond , $n = 20$) or controlled stripping (\blacklozenge , $n = 16$) prior to TL application. The solid line is the regression curve in Fig. 2: ($AUC_{blood}/TL \text{ dose} = (4.037 \times TEWL) - 64.872$) and ($AUC_{blood}/\text{application area}/TL \text{ concentration in the ointment applied} = (0.404 \times TEWL) - 6.487$). The dashed lines show the 95% confidence interval from the data of in Fig. 2.

第 3 節 角層除去皮膚におけるタクロリムス全身移行性に及ぼす皮膚内の種々状態変化の影響

AD の皮疹は増悪と寛解を繰り返しながら慢性的に経過しする。そのような皮膚では角層バリア能の低下だけでなく、特に急性増悪時に、炎症の急性反応として皮膚血流量の増大や血管透過性の亢進、それに伴う浮腫など皮膚微小循環系の変化が生じている^{35,38}。そこで、本節では、皮膚内部の生理状態を変化させる際の TL 全身移行動態への影響を評価し、その影響因子について調査した。まず第 1 項では、角層を除去したヘアレスラットの背部皮膚に起炎剤を皮膚内注射することで急性炎症を惹起させ、TL 全身移行動態への影響を評価した。第 2 項では、血管収縮剤としてアドレナリンをヘアレスラット角層除去背部皮下に持続投与し、TL 全身移行動態への影響を評価した。第 3 項では、ヘアレスラット角層除去背部皮膚に対してアドレナリンを混合した TL 軟膏を適用し、TL の全身移行が抑制されるかを検証した。

第 1 項 皮内浮腫を有する皮膚における軟膏適用後のタクロリムスの全身移行

ヘアレスラット背部皮膚をテープストリッピング処理することで角層を除去し、さらに起炎剤の皮内注射により浮腫が生じた角層除去起炎剤投与皮膚モデルを作成した。角層除去皮膚および角層除去起炎剤投与皮膚の TEWL および PU 値を Table 2 に示す。

Table 2 Physiological skin conditions prior to TL application.

	TEWL (g/m ² /h)	PU
Fully stripped skin	252 ± 17	347 ± 46
Fully stripped skin with the intradermal injections of PMS	235 ± 20	326 ± 99
Intact skin (Table 1)	6.7 ± 0.8	151 ± 33

Each datum represents the mean ± SD.

テープストリッピング処理での角層除去により、角層除去皮膚の TEWL および PU 値は正常皮膚に比べて顕著に増大した。すなわち、テープストリッピング処理は、角層バリア能の低下だけでなく、皮膚微小循環血流の増大を引き起こしているものと考えられた。一方で、角層除去皮膚に対する起炎剤投与の有無による両パラメーターの差は認められなかった。

角層除去起炎剤投与皮膚に 0.1^w/_w% TL 軟膏を密封塗布（軟膏適用面積 5.0 cm²，軟膏適用量 10 mg/cm²）し、TL の全身移行動態を評価した。角層除去皮膚および角層除去起炎剤投与皮膚に対して TL 軟膏を塗布した後の全血中 TL 濃度推移を Fig. 5 に示す。

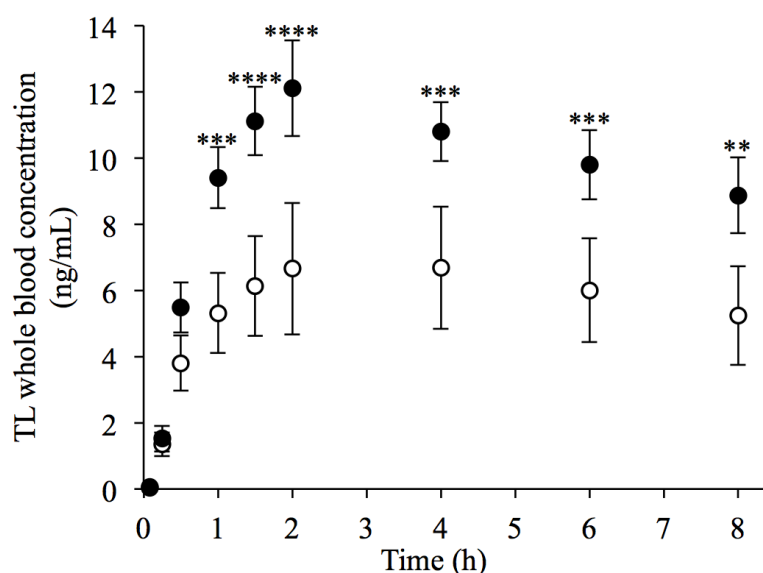


Fig. 5 TL whole blood concentration following application of 0.1^w/_w% TL ointment on fully stripped rat skin (5.0 cm²) with or without intradermal injections of the PMS.

Symbols: ●- fully stripped skin with intradermal injections of the PMS; ○- fully stripped skin without injections of the PMS. Each value is expressed as mean ± SD (n = 3, 4); ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001 for the Bonferroni's test following two-way ANOVA.

角層除去起炎剤投与皮膚における TL の血中濃度は、角層除去皮膚に比べて、軟膏適用 30 分後から有意に高い推移を示した (Fig. 5)。角層除去皮膚と角層除去起炎剤投与皮膚の間で、TEWL と PU 値に差がないことから (Table 2)、起炎剤投与による TL の吸収増大を、皮膚血流量の変化のみで説明することはできず、別の皮内環境の変化も影響していると考えられた。

第 2 項 血管収縮剤皮下投与皮膚における軟膏適用後のタクロリムスの全身移行

第 1 項において、角層除去皮膚への起炎剤の皮内投与により TL の全身移行動態が変化した。また、テープストリッピング処理による皮膚血流量の増大が観察され、一方で起炎剤投与の有無による皮膚血流量の違いは観察されなかった。AD の急性期では、健常人および慢性期の患者に比べて皮膚の血流量が増大している³⁵。そこで、第 2 項では、皮膚血流量の影響に着目した評価を行った。すなわち、血管収縮剤としてアドレナリンを皮下投与することで皮膚血流を変化させ、TL の全身移行動態に及ぼす皮膚血流の影響を評価した。

Fig. 6 に、アドレナリンを投与した皮膚への TL 軟膏皮膚適用試験の概略図を示す。TL の血管取り込みに対する皮膚血流の影響を評価するためには、アドレナリンの効果を皮膚局所に限定させ、TL の全身的な分布および消失過程に影響を及ぼさないように考慮する必要がある。そこで、アドレナリンを皮膚局所に送達させる目的で、マイクロダイアリシスプローブを皮下に留置した。プローブの中心部はミックスセルロース製の透析膜から成り、アドレナリンを含有した溶液をプローブ内に灌流させると、透析膜内外の濃度勾配によりアドレナリンがプローブの膜周辺部へと受動拡散する⁴⁹。なお、プローブ挿入による皮内環境への影響を最小限に抑えるため、プローブの留置部位を皮下とした^{50,51}。さらに透析膜内外の浸透圧差を無くすために、プローブ内に灌流させる溶液を pH 7.4 リン酸緩衝液 (PBS) とした。

テープストリッピング処理を行った背部皮膚の皮下に留置したプローブ (molecular weight cut off: 50 kDa) に 500 µg/mL アドレナリン含有 PBS を流速 1.0 µL/min で 1 時間灌流させて皮膚血流を安定化させた⁵²。プローブ膜透過部が位置する角層除去背部皮膚部分に 0.1^w/_w% TL 軟膏を密封塗布 (軟膏適用面積 0.79 cm², 軟膏適用量 10 mg/cm²) した。また、この対照群として、アドレナリンを含有しない PBS をプローブ内に灌流した角層除去皮膚についても試験した。それぞれの皮膚の軟膏塗布前の TEWL および PU 値、TL の血中濃度推移を Fig. 7 に示す。

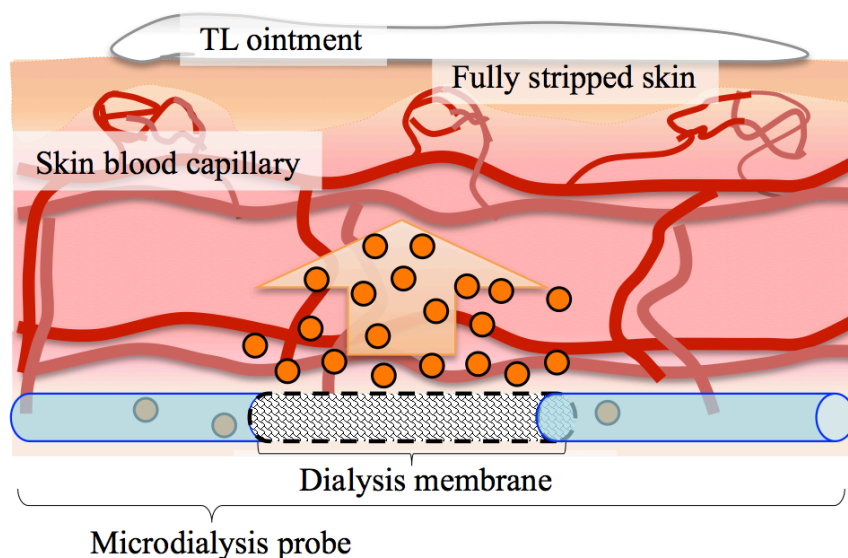


Fig. 6 TL absorption study on fully stripped skin with subcutaneous infusion of adrenaline (Adr) from microdialysis probe in subcutaneous tissue.

Adr (500 $\mu\text{g/mL}$) in PBS (pH 7.4) was perfused in microdialysis probe at a rate of 1.0 $\mu\text{L/min}$. Adr was released through the dialysis membrane (molecular weight cut off: 50 kDa) to the subcutaneous tissue.

アドレナリン皮下投与皮膚の PU 値は、角層除去皮膚 (PU: 230 ± 60) に比べて、有意に低い値 (PU: 72 ± 19) を示した (Fig. 7B)。TEWL 値においても、角層除去皮膚 (TEWL: $225 \pm 14 \text{ g/m}^2/\text{h}$) に比べて、アドレナリン皮下投与皮膚で有意に低い値 (TEWL: $191 \pm 9 \text{ g/m}^2/\text{h}$) を示した (Fig. 7 A)。アドレナリン皮下投与皮膚における TEWL 値の低下は、皮膚血流量の低下による影響と考えられた⁵³。アドレナリン投与皮膚において、軟膏塗布 15 分後から試験終了 2 時間の間、TL の血中濃度推移は有意に低い推移を示した (Fig. 7 C)。そのため、角層バリアが機能していない皮膚においては、皮膚血流量が TL の全身移行動態に大きく影響することが明らかとなった。

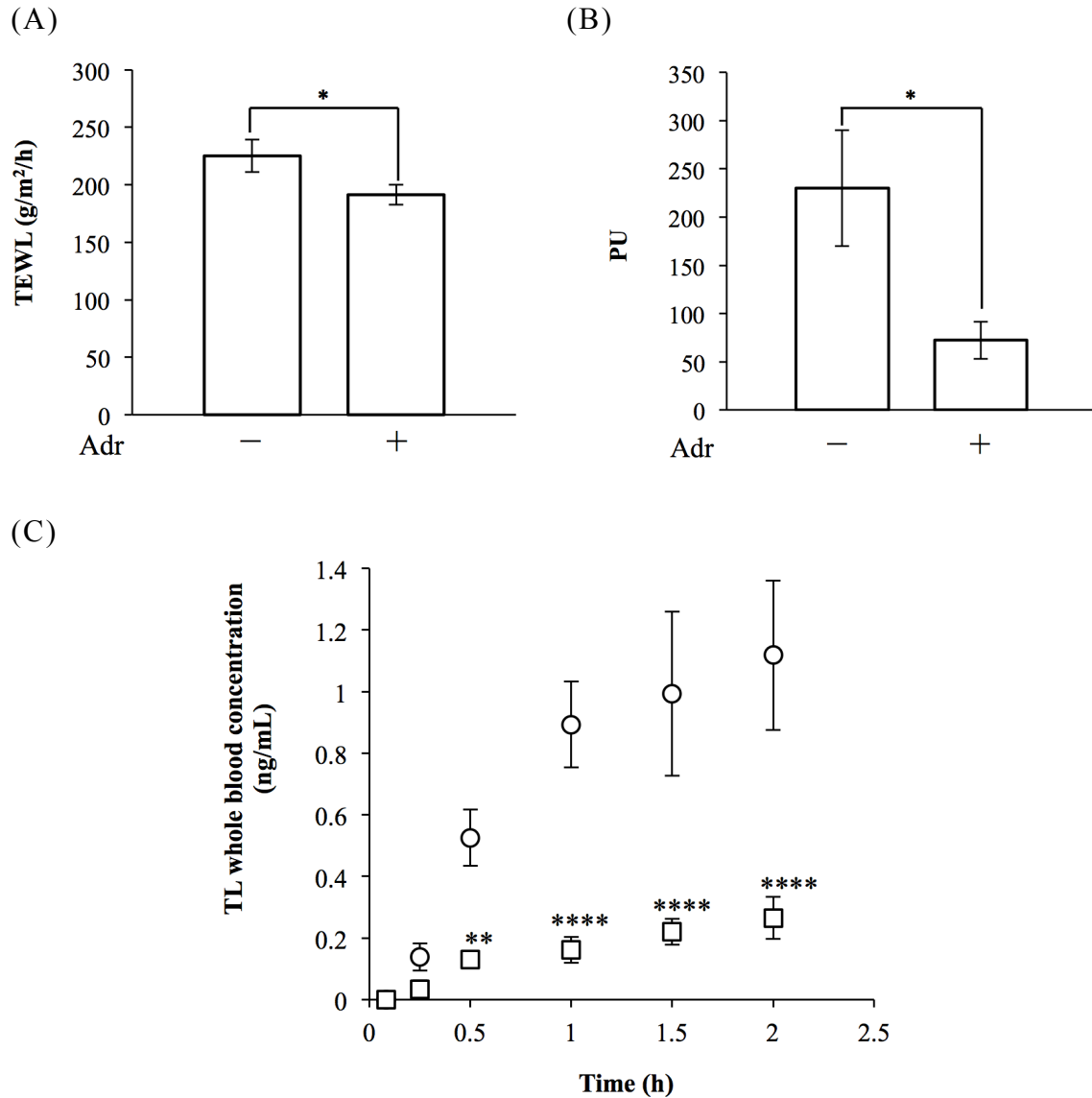


Fig. 7 Physiological skin conditions prior to TL application (A, TEWL; B, PU) and TL systemic absorption following application of 0.1^w/_w% TL ointment on fully stripped rat skin (0.79 cm²) (C) with or without subcutaneous infusion of Adr.

TEWL (A) and PU (B) were measured prior to TL application on the skin infused with Adr-free (-) PBS and Adr-dissolved (+) PBS. Symbols in (C): ○ - infusion of Adr-free PBS (infusion rate, 1 μL/min); □ - infusion of Adr solution (Adr in PBS, 500 μg/mL; infusion rate, 1.0 μL/min). Each value is expressed as mean ± SD (n = 3): (A, B), **P* < 0.05, unpaired *t* test; (C), ***P* < 0.01, *****P* < 0.001 for Bonferroni's test following two-way ANOVA.

第 3 項 血管収縮剤併用皮膚適用によるタクロリムス全身移行の抑制効果

本節の第 2 項において、アドレナリンの皮下投与による皮膚血流量の低下が、TL の全身移行を強く抑制した。そのため、角層除去皮膚における全身循環系への TL の吸収は皮膚血流律速であることが考えられた。そこで、第 3 項では、TL 軟膏にアドレナリンを混合し、それを皮膚適用した後の TEWL および PU 値の変化、そして両パラメーターと TL 全身移行動態の関係を評価した。

0.1% TL 軟膏にアドレナリンを 0.25 および 0.50^{w/w}% となるように混合した。それぞれの軟膏をヘアレスラット背部皮膚に適用し、その影響を評価した。0.25% アドレナリン含有 0.1^{w/w}% TL 軟膏は角層除去皮膚および角層除去起炎剤投与皮膚に、一方、0.50% アドレナリン含有 0.1^{w/w}% TL 軟膏は角層除去起炎剤投与皮膚に密封塗布（軟膏適用面積 5.0 cm²、軟膏適用量 10 mg/cm²）した。軟膏適用前の TEWL および PU 値を Fig. 8A および B に示す。角層除去皮膚および角層除去起炎剤投与皮膚の TEWL および PU 値は、TL 軟膏またはアドレナリン含有 TL 軟膏塗布前において全ての群の間で有意な差は観察されなかった。各群間で軟膏塗布前の皮膚バリアおよび血流量に有意な差がないため、TL 全身移行性に対するアドレナリン混合の影響を考察できると考えられた。

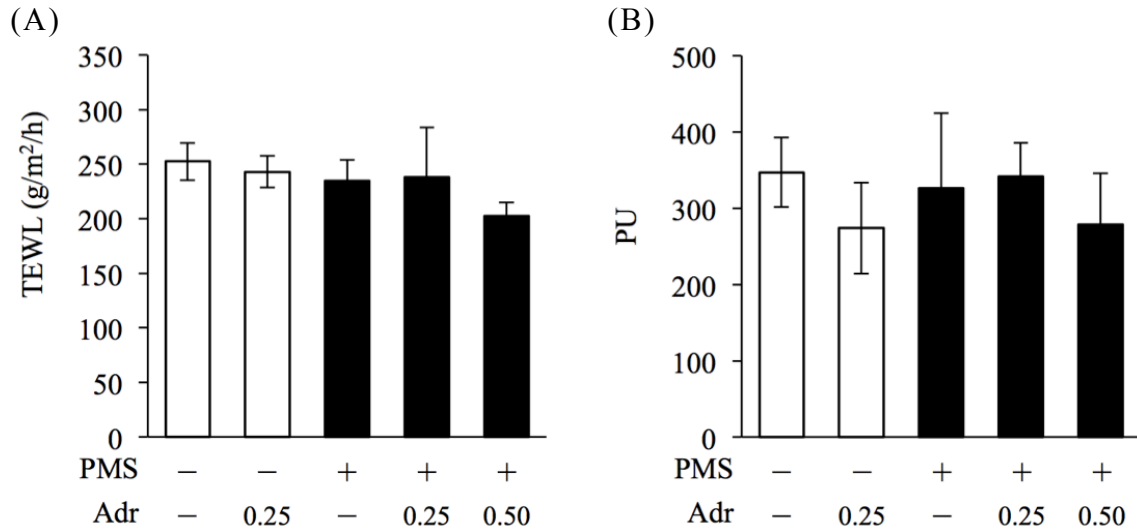


Fig. 8 Physiological skin conditions (A, TEWL; B, PU) prior to application of 0.1% TL ointment (Adr, -) or Adr-mixed (Adr, 0.25 or 0.50 ^{w/w}%) 0.1% TL ointment on fully stripped rat skin (5.0 cm²) with (PMS, +) or without (PMS, -) intradermal injections of the PMS.

Each value is expressed as mean \pm SD (n = 3, 4). There were no statistically significant differences among groups as determined by one-way ANOVA (TEWL, $P = 0.205$; PU, $P = 0.573$).

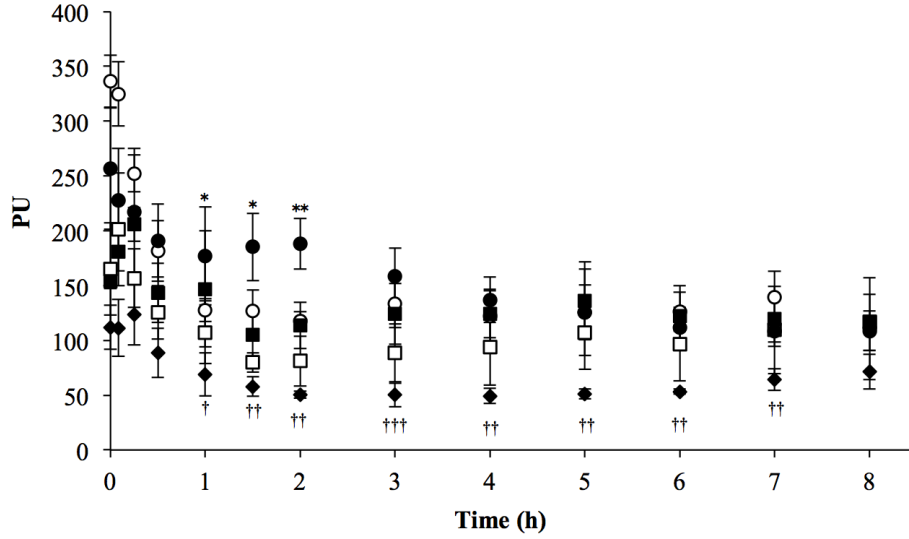
角層除去皮膚および角層除去起炎剤投与皮膚に対して、各軟膏を適用した後の皮膚血流量および全 TL 血中濃度の推移をそれぞれ Fig. 9A および B に示す。

TL を単独で適用した角層除去皮膚 (○) の血流は、軟膏適用直後から経時的に低下し、適用 1 時間以降で一定に推移した (Fig. 9A)。軟膏適用直後の血流低下は、軟膏剤塗布による皮膚表面温度の低下が原因で生じたと考えられた。そこで、軟膏適用 1 時間以降の血流値に関して、TL 単独適用の角層除去皮膚を対照群とし、各群と比較した。TL 単独適用の角層除去起炎剤投与皮膚 (●) の血流量は、適用 2 時間をピークとする有意な増加を示し、それ以降では対照群と同程度に推移した。0.25% アドレナリン混合軟膏を塗布した角層除去皮膚 (□) の血流量は、適用 1.5 時間後まで低下傾向を示し、その後緩やかに上昇して対照群と同等の推移を示した。0.50% アドレナリン含有 TL 軟膏を塗布した角層除去起炎剤投与皮膚 (◆) の血流量は、対照群 (○) に比べて軟膏適用 7 時間まで有意に低く推移した。

角層除去皮膚に 0.25% アドレナリン混合軟膏を塗布すると (□)、全 TL 血中濃度は、アドレナリンを混合適用していない角層除去皮膚と比べて 1.5 時間および 2 時間値で有意に低い値を示した (Fig. 9B)。角層除去起炎剤投与皮膚に対する 0.25% アドレナリン混合軟膏の塗布では (■)、TL 単独適用の角層除去起炎剤投与皮膚 (●) と同様に高い血中濃度推移が観察された。しかしながら、アドレナリン含有濃度を 0.50% に上げた場合 (◆)、適用直後から観察された全 TL 血中濃度の上昇は、適用 1 時間後から緩やかとなり、適用 4 時間後まで TL 単独塗布よりも低い血中濃度を示した。

Fig. 9 をもとに、PU-時間曲線下面積 AUC_{PU} および血中濃度-時間曲線下面積 AUC_{blood} を算出し、その結果をそれぞれ Fig. 10A および B に示す。

(A)



(B)

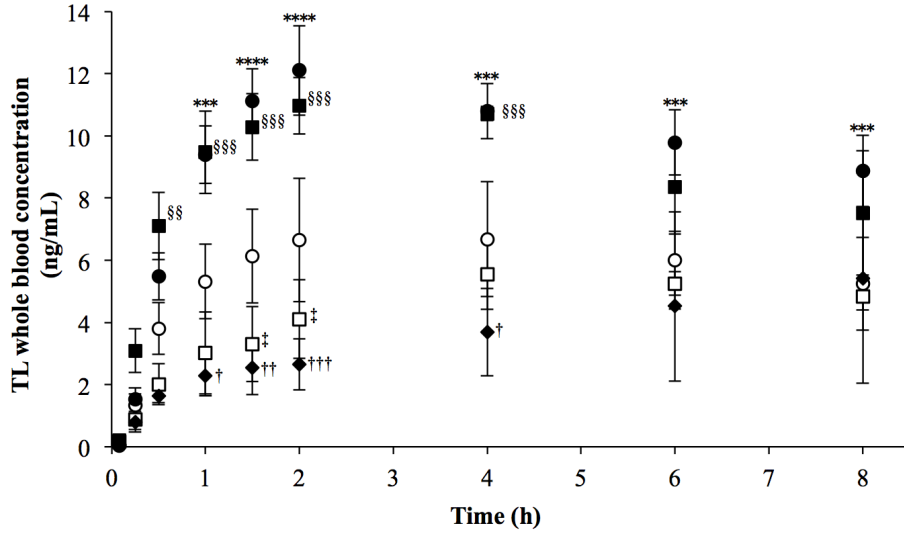


Fig. 9 PU-time profile (A) and TL whole blood concentration-time profile (B) following application of 0.1^{w/w}% TL ointment (Adr, -) or Adr-mixed (0.25 or 0.50^{w/w}%) 0.1^{w/w}% TL ointment on fully stripped rat skin (5.0 cm²) with or without the PMS injections.

Symbols: ○ - PMS (-), Adr (-); □ - PMS (-), Adr (+, 0.25^{w/w}%); ● - PMS (+), Adr (-); ■ - PMS (+), Adr (+, 0.25^{w/w}%); ◆ - PMS (+), Adr (+, 0.50^{w/w}%). Each value is expressed as mean ± SD (n = 3, 4); **P* < 0.05, ***P* < 0.01 for ● vs ○, †*P* < 0.05, ††*P* < 0.01, †††*P* < 0.005 for ◆ vs ○, ‡*P* < 0.05 for □ vs ○, §§*P* < 0.01, §§§*P* < 0.005 for ■ vs ○, Dunnett's test following two-way ANOVA for data of 1h-8h.

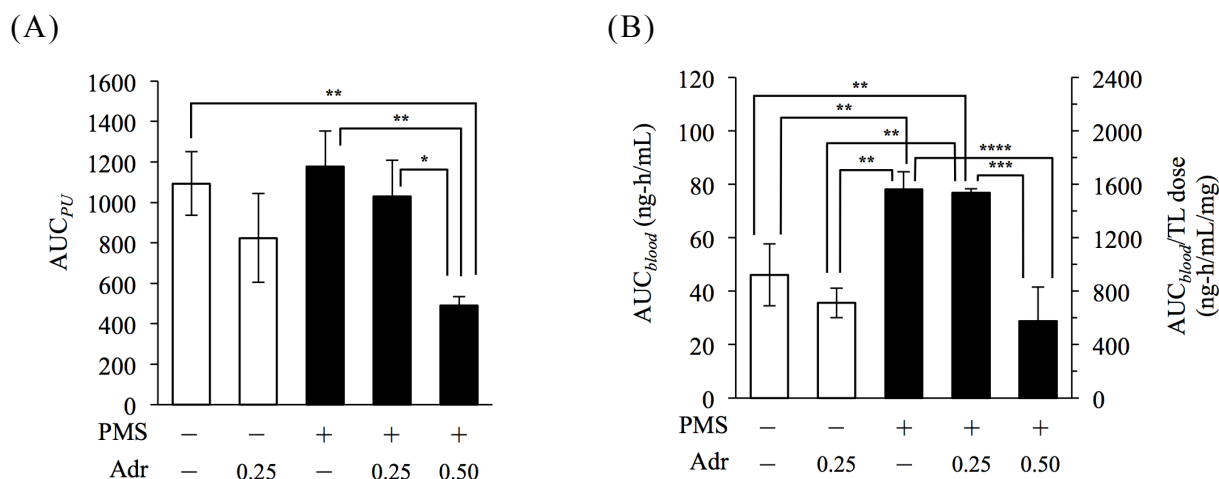


Fig. 10 Physiological skin conditions (A, AUC_{PU}) and TL systemic absorption (B, AUC_{blood}) following application of 0.1^{w/w}% TL ointment (Adr, -) or Adr-mixed (Adr, 0.25 or 0.50^{w/w}%) 0.1% TL ointment on fully stripped rat skin (5.0 cm²) with or without the PMS injections.

Each value is expressed as mean ± SD (n = 3, 4); **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001 between two groups, the Tukey-Kramer method following ANOVA.

AUC_{PU} における多群間比較で有意な差が観察されたことから (Fig. 10A)、AUC_{PU} は試験終了時までの血流量の変化を反映する、より鋭敏なパラメーターであると考えられた。アドレナリンを混合適用した角層除去皮膚の AUC_{PU} は低下する傾向を示した。0.25%アドレナリン混合軟膏を適用した角層除去起炎剤投与皮膚の AUC_{PU} は低下傾向にあり、アドレナリン濃度を 0.50%とした場合、AUC_{PU} は有意に低下した。アドレナリンを混合適用した角層除去皮膚の AUC_{blood} は低下傾向にあった (Fig. 10B)。起炎剤の投与の有無による AUC_{PU} の変化は観察されなかったが、AUC_{blood} は起炎剤の投与により有意に増大した。このことから、起炎剤投与による TL 全身移行性の増大は、皮膚血流量のみで説明することは出来なかった。そのため他の要因、例えば第 1 節で示した起炎剤投与による浮腫形成、すなわち血管透過性の亢進も TL 全身移行性の増大に関係すると考えられた。角層除去起炎剤投与皮膚に対して 0.25%アドレナリン混合軟膏を適用した場合でも、TL 吸収量の増大は抑制されなかった。しかしながら、0.50%アドレナリン混合軟膏の塗布では、角層除去起炎剤投与皮膚の AUC_{blood} が有意に低下した。

さらに、TEWLおよび AUC_{PU} をそれぞれ AUC_{blood} と統合してFig. 11AおよびBに示し、TL 全身移行に対するアドレナリン混合塗布の影響を評価した。

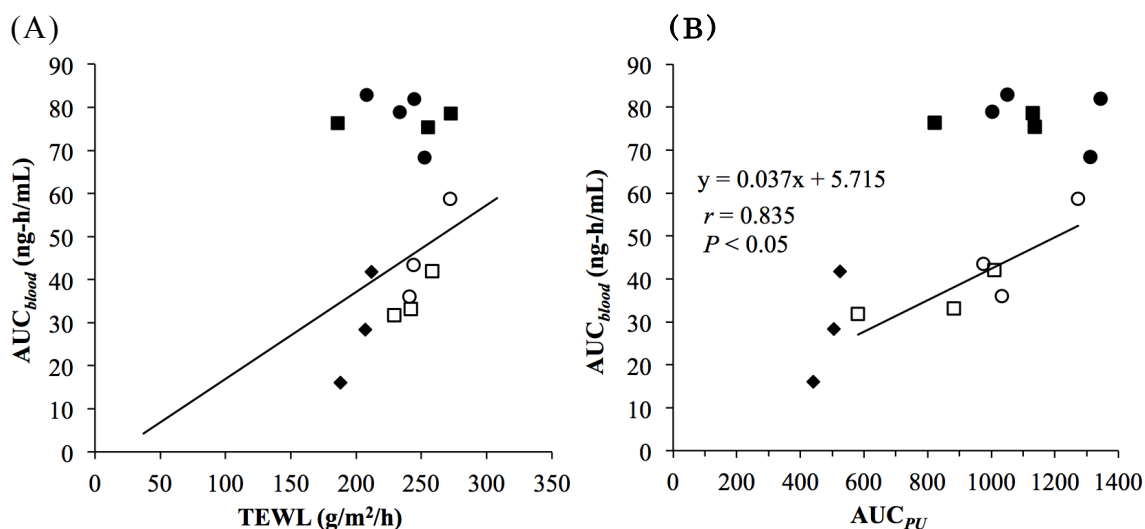


Fig. 11 Relationship between physiological skin conditions (A, TEWL; B, AUC_{PU}) and AUC_{blood} following application of 0.1^{w/w}% TL ointment or Adr-mixed 0.1% TL ointment on fully stripped rat skin (5.0 cm²) with or without the PMS injections.

Symbols: ○ - PMS (-), Adr (-); □ - PMS (-), Adr (+, 0.25^{w/w}%); ● - PMS (+), Adr (-); ■ - PMS (+), Adr (+, 0.25^{w/w}%); ◆ - PMS (+), Adr (+, 0.50^{w/w}%). The solid line in (A) is the regression curve in Fig. 2: ($AUC_{blood} = (0.202 \times TEWL) - 3.244$). The solid line in (B) is the regression curve calculated from data for open symbols; the r and P value were calculated by the Pearson test.

Fig. 11A の直線は、Fig. 2 に示した 0.1^w/_w% TL 軟膏を塗布（軟膏適用面積 5.0 cm²，軟膏適用量 10 mg/cm²）した際の回帰直線である。角層除去皮膚に TL 単独軟膏（○）および 0.25% アドレナリン混合軟膏（□）を適用した場合、TL 全身移行量は回帰直線に対して良好な一致を示した。一方、角層除去起炎剤投与皮膚に TL 単独軟膏（●）を適用した場合のデータは、回帰直線に対して明らかに高い位置にプロットされた。角層除去急起炎剤投与皮膚に 0.25% アドレナリン混合軟膏（■）を適用した場合のデータも同様に回帰直線に対して高い位置にプロットされた。一方で、アドレナリン含有濃度を 0.50%（◆）として角層除去急起炎剤投与皮膚に適用した場合のデータは、回帰直線に一致するようにシフトした。Fig. 11B より、角層除去皮膚に対して TL 単独軟膏（○）および 0.25% アドレナリン混合軟膏（□）を適用すると、AUC_{PU} と AUC_{blood} との間には正の相関関係があることが明らかとなった。角層除去起炎剤投与皮膚に対して TL 単独軟膏（●）および 0.25% アドレナリン混合軟膏（■）を適用した際のデータは、この相関関係よりも高い位置にプロットされた。このことから、角層バリアが障害され皮内に浮腫が生じた皮膚では、血流量の増加だけでなく、血管透過性亢進によって TL 全身移行量の増大が生じていると考えられた。一方、0.50% アドレナリン混合軟膏（◆）を適用した場合のデータは、回帰直線に一致するようにシフトした。ことことから、アドレナリンの適用により、血流量が減少すると同時に血管透過性も抑制されることが考えられた。

第 4 節 小括

本章では、まず第 1 節にてヘアレスラット背部皮膚の角層バリア能と TL 全身移行性の関係性を評価した。その結果、正常皮膚から全身循環への TL の吸収は乏しく、また角層バリアが正常に機能する場合、起炎剤投与に伴う皮膚内部の環境変化による影響を受けないことを明らかにした。さらに、角層バリア能の低下とともに TL 全身移行量の増大が観察され、TEWL と TL の全身移行量が正の相関関係にあることを明らかにした。

第 2 節では、TL 軟膏の適用条件と TL 全身移行性の関係性について評価した。その結果、TL 全身移行量は、軟膏中 TL 濃度および軟膏の適用面積と比例関係にあり、TL が基本的な拡散理論に従って全身循環へ吸収されることを明らかにした。

第 3 節では、角層除去皮膚において、起炎剤の皮内投与により、TL の全身移行動態が変化することを明らかにした。そこで、皮膚微小循環系に着目し、TL 全身移行動態との関係性を評価した。その結果、角層を除去し、アドレナリンを皮下に持続投与した皮膚では、皮膚血流量の減少により TL の全身移行量が低下した。さらに、角層除去起炎剤投与皮膚では、皮膚血流量の増大だけでなく、血管透過性の亢進により、TL の全身移行量が増加することを明らかにした。そして、TL 軟膏にアドレナリンのような血管収縮剤を混合して適用することで、血流量や血管透過性の上昇を抑え、TL の全身移行を抑制できることを明らかにした。

AD 患者の皮膚において、角層バリア能が障害されていない場合、TL 全身移行の律速段階は角層の透過過程であり、一方、角層バリア能が障害された場合には、TL 全身移行量の増大が生じると考えられる。そのため、TEWL の測定により角層バリア能を評価することで、TL 全身移行量を予測し、TEWL に応じた軟膏の希釈により TL 全身移行量の制御が期待できる。AD 患者では、皮疹部のみならず無疹部においても TEWL の上昇が認められており、角層バリア能の低下が生じている³⁷。無疹部への軟膏の塗布、すなわち過剰な面積への TL の適用は、TL 全身移行量の増大が生じる可能性があり、好ましくない。そのため、皮膚病変の急性増悪に対して TL 軟膏を使用する場合は、TL 軟膏の塗布を皮疹部のみに制限することが推奨される。角層下の生きた表皮まで損傷が及ぶびらんのように皮膚バリアが極端に障害された皮膚は、外部刺激に敏感であり、血流や血管透過性の変化が生じていることが考

えられる。このような皮膚に対する TL 軟膏の使用は、TL の全身循環への過度な吸収が予測されるため一般に推奨されない⁵⁴。しかしながら、血管収縮剤を併用することで血流や血管透過性の制御が可能であり、それにより、TL 全身移行の回避が期待でき、重度のバリア破綻をきたした皮膚においても TL 軟膏の使用が可能になると考えられる。

これらの結果考察より、全身性副作用予防の観点から、皮膚状態に合わせた TL 軟膏の適用法に関してフローチャートを作成した (Fig. 12)。TL 経皮吸収の最大の障壁は角層であるため、TEWL の測定による角層バリア能の評価が重要となる。角層バリア能が過度に障害されていた場合、TL 全身移行に対する皮内環境、特に皮膚微小循環系の影響が顕著となる。そこで、皮膚血流の測定もしくは、専門医による肉眼所見から皮内状態を評価する。皮膚血流が増加していない、もしくは皮膚の発赤が観察されない場合は、角層バリア能に応じた軟膏の希釈を行う。一方で、炎症の急性増悪時のように、血流量が増大している、もしくは発赤が観察される場合は、軟膏の希釈だけでなく、血管収縮剤の併用を行う。角層バリア能の評価に関しては、Tewameter[®] MSC100/TM300 (Courage & Khazaka, Koeln, Germany) や本検討で使用した VapoMeter[®] (Delfin Technologies Ltd, Kuopio, Finland) など、小型で持ち運びが可能な測定機器により簡便かつ短時間で TEWL の測定が可能である。しかしながら、皮膚血流の測定には、大型の血流測定装置が必要となるため、今後、血流測定装置の小型化により、血流測定が簡便化されることで皮膚血流の定量的な評価が期待される。

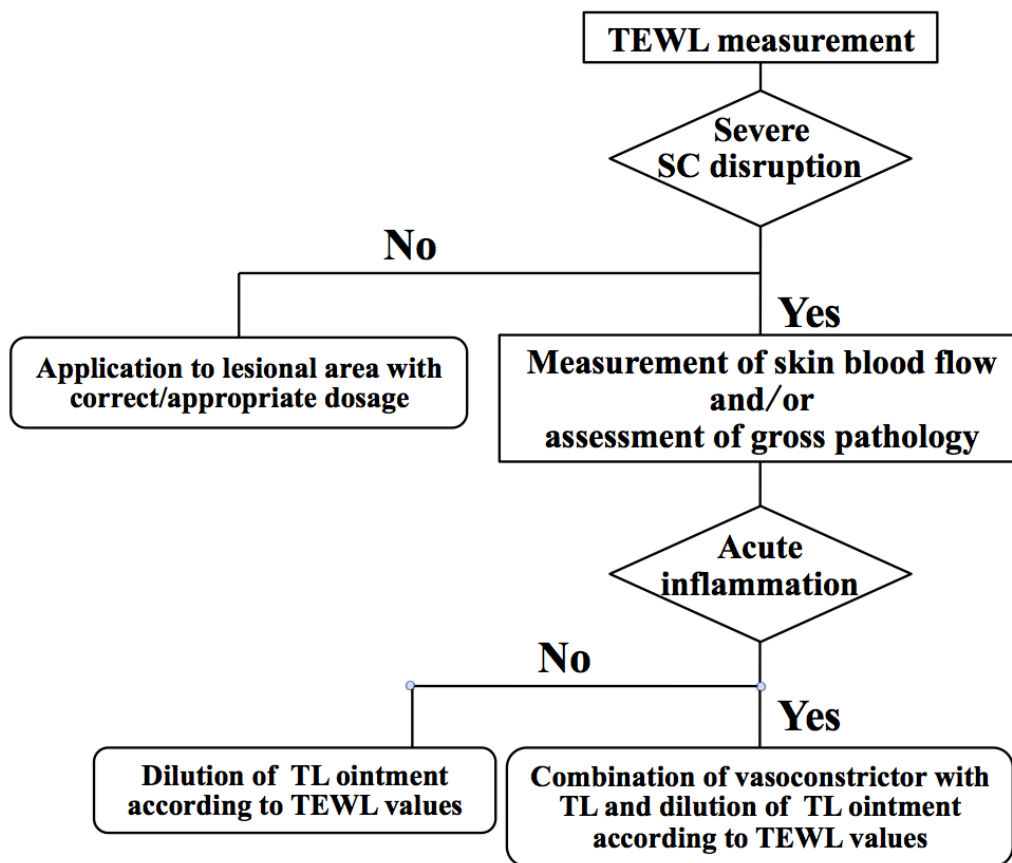


Fig. 12 Flowchart for prevention of systemic side effects in AD therapy using TL ointment.

第 2 章 タクロリムスの全身および皮膚局所動態に及ぼす血管外漏出タンパク質の影響に関する検討

炎症の急性反応である血管透過性の亢進は、通常では血管外へと漏れ出ることのない血漿タンパク質の漏出を引き起こす。血管内の血漿タンパク質濃度は組織間隙よりも高いため、組織中へと漏出した血漿タンパク質は、直接血管内へと戻ることは考えにくい。このため、組織液とともにリンパ系へと汲み取られるまでの間、タンパク質は皮膚組織中に滞留する。TL は、タンパク結合性が高いことが知られており、特に、炎症の急性期に産生が促進される α_1 -酸性糖タンパク質に高い結合性を示す^{55,56}。そのため、経皮適用された TL が皮膚の組織液に含まれる血管外漏出タンパク質と相互作用し、TL の皮膚内動態に変動が生じると予想される。TL は皮膚局所での作用が望まれるため⁵⁷、TL の皮膚中濃度とそれに及ぼす皮内炎症の影響を検討することは重要である。

そこで本章では、TL の全身移行動態および皮膚局所濃度に対する血管外漏出タンパク質の影響を評価した。第 1 章 3 節 1 項では、角層除去起炎剤投与皮膚に、0.1% TL 軟膏を塗布した。本章 1 節では TL 全身移行の抑制を期待して希釈した軟膏を塗布することで、TL 低濃度軟膏適用時における TL の全身移行動態を血中濃度の時間変化に着目して評価した。第 2 節では、希釈軟膏適用時の皮膚中 TL 濃度を測定し、角層除去急性炎症皮膚における TL の皮膚局所滞留性について考察した。

第 1 節 タクロリムス希釈軟膏適用時における皮内浮腫のタクロリムス全身移行動態への影響

軟膏の希釈によって軟膏中 TL 濃度が減少することで、皮膚中への TL の拡散移行速度が低下し、その結果として皮膚中 TL 濃度の減少が予測される。血管から漏出したタンパク質が皮膚組織中に存在する場合、タンパク結合性の高い TL が漏出タンパク質と結合することで、皮膚中での拡散はさらに遅延することが予想される^{33,58}。そのため、市販軟膏である 0.1 および 0.03 % の通常の軟膏中 TL 濃度で投与した場合とは TL の経皮吸収動態が異なることが考えられる。そこで、0.1% TL 軟膏から希釈した 0.004 および 0.003^{w/w}% TL 軟膏を、角層除去起炎剤投与皮膚に密封塗布（適用面積 5.0 cm²，軟膏適用量 10 mg/cm²）し、TL の全身移行動態を評価した。適用した軟膏中の TL 濃度が 2 種類であるため、血中濃度を適用 TL 量で標準化し、その血中濃度推移を Fig. 13 に示す。

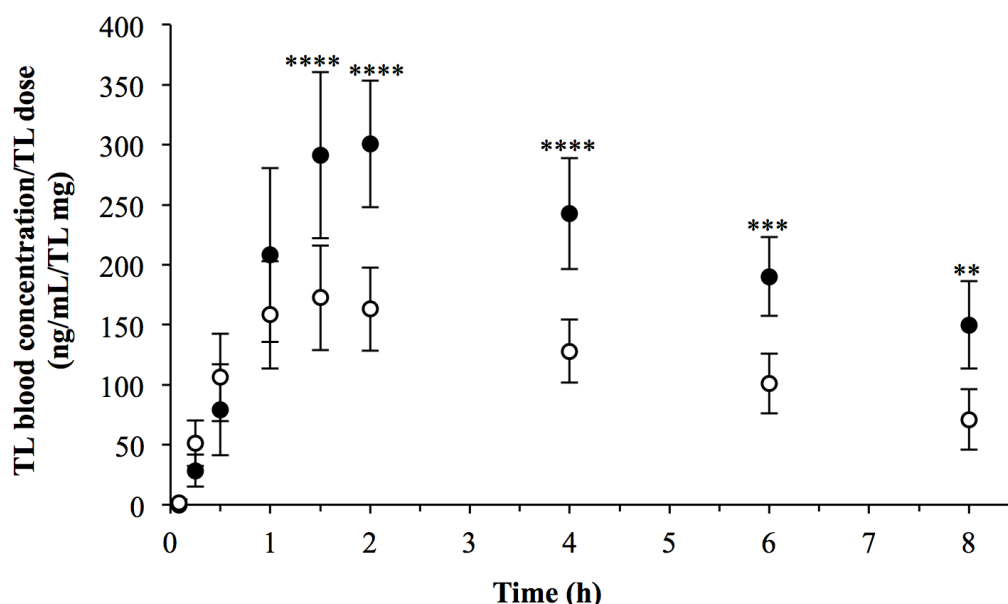


Fig. 13 TL whole blood concentrations following application of 0.004 or 0.003^{w/w}% TL ointment diluted with liquid paraffin on fully stripped rat skin (5.0 cm²) with or without the PMS injections.

Symbols: ● - intradermal injection of the PMS; ○ - non-injection of the PMS. Each value is expressed as mean \pm SD (n = 7, 9); ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, for the Bonferroni's multiple comparisons following two-way ANOVA.

希釈軟膏による経皮吸収試験の結果、角層除去皮膚に比べて角層除去起炎剤投与皮膚において、軟膏塗布 15 分および 30 分後の全血中 TL 濃度が低い傾向を示した。一方、軟膏塗布 90 分以降では、角層除去起炎剤投与皮膚において有意に高い血中濃度となった。第 1 章 Fig. 5 で示した角層除去起炎剤投与皮膚に対する 0.1% TL 軟膏の適用では、軟膏適用直後の TL 吸収の遅延が観察されなかったことから、投与量の違いによって TL の全身移行が異なる挙動を示したことになる。そこで、軟膏適用 15 分および 90 分後において TEWL に対する各個体の血中濃度データを比較することとした。希釈軟膏 (0.004 および 0.003%) を角層除去皮膚および角層除去起炎剤投与皮膚に密封塗布した際の軟膏適用直前の TEWL と塗布 15 分 (C15) および 90 分 (C90) 後の血中濃度の関係を Fig. 14A および B に示す。また、比較対象として通常の軟膏中 TL 濃度 (0.1 および 0.03 %) である市販製剤を角層除去皮膚、角層除去起炎剤投与皮膚、テープストリッピング処理調整皮膚に密封塗布した際の適用直前の TEWL と塗布 15 分および 90 分後の血中濃度の関係を Fig. 14C および D に示す。

その結果、0.1 および 0.03% の市販軟膏塗布 15 分および 90 分後の全血中 TL 濃度は、起炎剤を投与していないテープストリッピング処理調整皮膚および角層除去皮膚で TEWL と有意な相関を示した (15 min (C): $r=0.760$, $P<0.0001$, 90 min (D): $r=0.940$, $P<0.0001$)。角層除去起炎剤投与皮膚では、90 分後において、回帰直線よりも上にデータがプロットされた。この結果は、第 1 章で述べた TL の全身移行に対する皮膚血流や血管透過性の寄与を支持するものであった。一方、希釈軟膏塗布 15 分後の角層除去起炎剤投与皮膚のデータは、角層除去皮膚のデータよりも低い位置にプロットされた (Fig. 14A)。そして、90 分では、市販軟膏を適用した場合と同様に、角層除去起炎剤投与皮膚で、角層除去皮膚よりも高い血中濃度を示した (Fig. 14B)。これらのことから、希釈軟膏を適用した場合、15 分のような塗布直後には、炎症の急性反応に伴う皮内環境の変化、例えば血管外に漏出したタンパク質との相互作用が影響し TL 全身移行を低下させたと考えられる。その後、時間経過に伴い皮膚内への TL 移行量が増加することでタンパク結合が飽和し、血管透過性亢進および血流量増大に起因する遊離形 TL の吸収増大が生じたと考えられる。

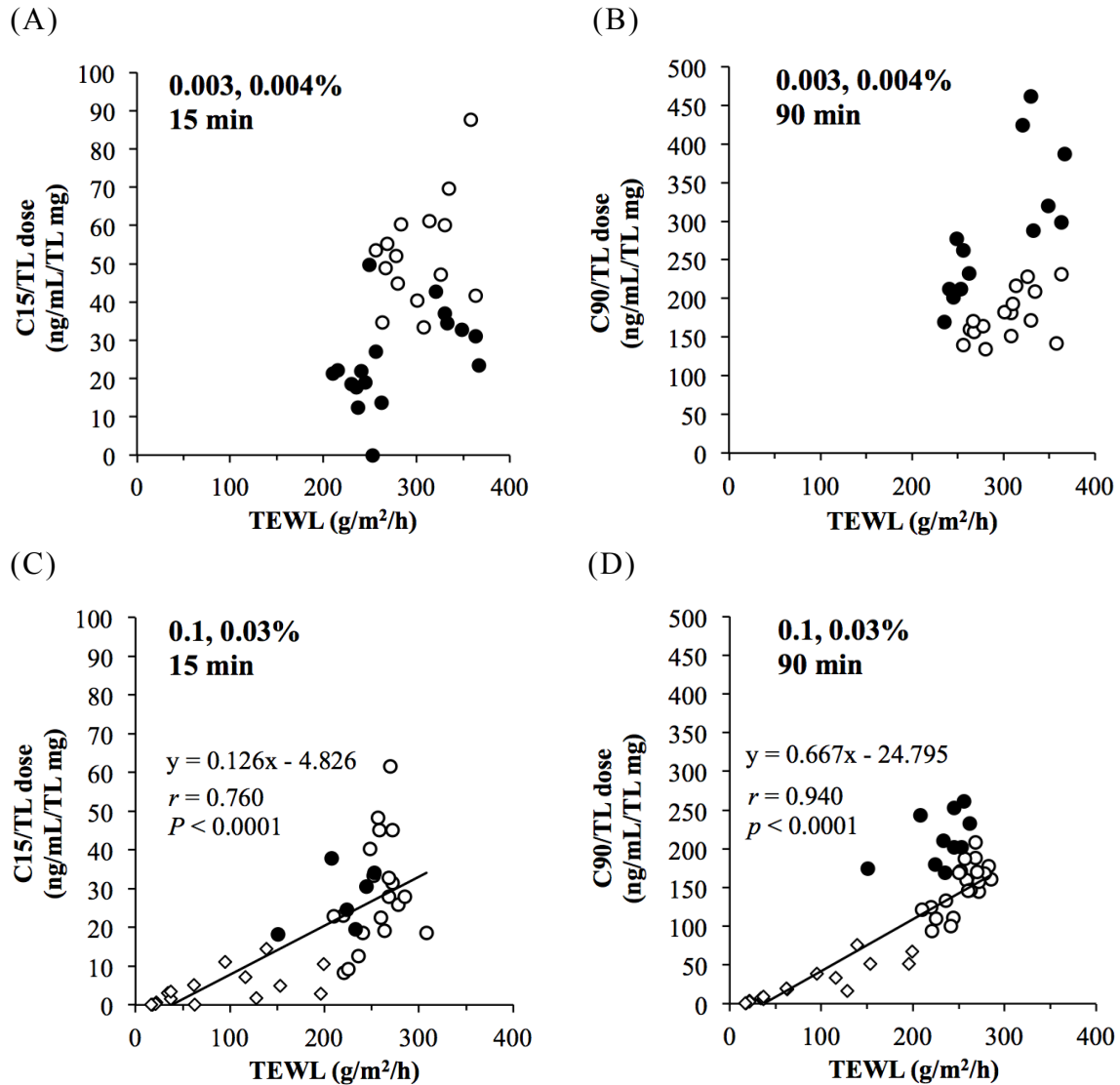


Fig. 14 Relationship between skin barrier function and TL whole blood concentrations 15 min (C15; A and C) or 90 min (C90; B and D) following application of TL ointment to the skin treated with full-stripping (○), controlled stripping (◇) or fully stripped skin with the PMS injections (●) with TL concentrations in the applied ointment of 0.004, 0.003 (A and B), 0.1 or 0.03^{w/w}% (C and D) and various application areas.

The solid lines in (C and D) were the regression curves calculated from data for open symbols. The r and P value were calculated by the Pearson test.

第 2 節 タクロリムス低用量時における皮内浮腫とタクロリムス皮膚局所移行動態の関係

第 1 節において、角層が完全に除去され皮内浮腫を有する皮膚に希釈軟膏を適用すると、適用初期に TL 吸収の遅延が観察された。これは、血管外漏出タンパク質との相互作用による可能性が考えられた。すなわち、TL が血漿タンパク質と結合することで皮膚組織中に留まり、遊離形薬物の血管内取り込みが抑制されたと考えられた。そこで、本節では、角層除去起炎剤投与皮膚において TL が皮膚組織中に滞留しているか検証するため、皮膚中 TL 濃度を評価した。

0.004^w/_w%希釈軟膏を角層除去皮膚および角層除去起炎剤投与皮膚に密封塗布（軟膏適用面積 5.0 cm²、軟膏適用量 10 mg/cm²）し、適用 15 分および 90 分後の皮膚を摘出した。摘出した皮膚をアセトニトリルに浸漬し、TL を抽出した。経皮吸収試験に先立ち、摘出皮膚からの TL 抽出率を算出した（角層除去皮膚：66.76 ± 3.05%、角層除去起炎剤投与皮膚：60.90 ± 5.25%）。希釈軟膏適用 15 分および 90 分後の摘出皮膚中 TL 濃度および全血中 TL 濃度、皮膚対血中濃度比をそれぞれ Fig. 15A, B および C に示す。

希釈軟膏適用 15 分後の全血中 TL 濃度は、第 1 節の結果と同様に、角層除去皮膚に比べて角層除去起炎剤投与皮膚で低い値を示した (Fig. 15B)。その一方で、同じ時間における皮膚中 TL 濃度は角層除去起炎剤投与皮膚でより高い値を示した (Fig. 15A)。したがって、その皮膚対血中濃度比においても角層除去起炎剤投与皮膚でより高い値となった (Fig. 15C)。このことから、角層除去起炎剤投与皮膚では、TL が皮膚局所に滞留していることが示された。この滞留は、皮膚を浸透する TL が血管から漏出したタンパク質に結合することで生じたと考えられる。起炎剤投与の有無に関わらず、希釈軟膏適用 15 分から 90 分の時間経過で全血中 TL 濃度が上昇しているのに対して、皮膚中 TL 濃度に変化は観察されなかった。このことから、軟膏適用 90 分後では、TL のタンパク質への結合は飽和しており、そのことが、起炎剤投与の有無での 15 分と 90 分の全血中 TL 濃度の逆転に関係していると考えられる。すなわち、起炎剤を投与した場合でもタンパク結合が飽和した後では、同等な組織中遊離形薬物濃度を示していると考えられる。

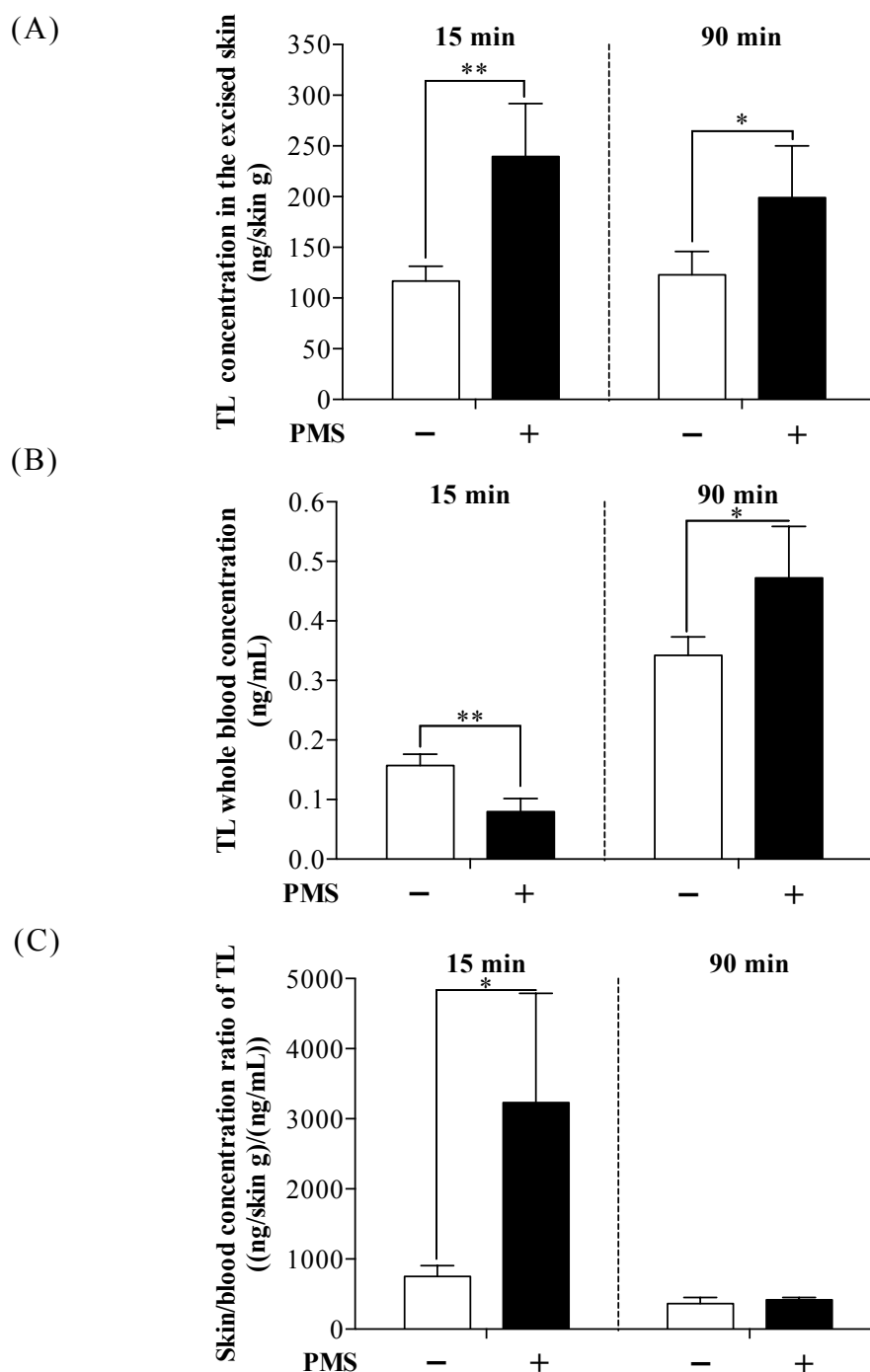


Fig. 15 TL concentration in the excised skin (A), TL whole blood (B) and skin/blood concentration ratio of TL (C) 15 min and 90 min following application of 0.004^w/_w% TL ointment on fully stripped skin without (-) and with (+) the PMS injections.

Each value is the mean + SD (n = 4): **P* < 0.05 and ***P* < 0.01 for each time point between two groups, unpaired *t* test.

第 3 節 小括

第 1 節では、角層除去起炎剤投与皮膚への希釈軟膏適用による TL 全身移行動態、すなわち全身移行の時間変化に着目して検討を行った。第 1 章の結果から、TL 全身移行の抑制を期待して用いた希釈軟膏を角層除去起炎剤投与皮膚に適用すると、適用直後に TL の吸収が遅れることを明らかにした。そこで、第 2 節において、角層除去皮膚および角層除去起炎剤投与皮膚に希釈軟膏を適用した際の皮膚中 TL 濃度を測定した。その結果、角層除去起炎剤投与皮膚において、軟膏の適用直後の全血中 TL 濃度は角層除去皮膚に比べて低かったにも関わらず、皮膚中 TL 濃度は高値を示した。すなわち、皮膚の組織液中に存在する血管外漏出タンパク質と TL が結合することで、皮膚組織中に TL が滞留し、全身循環への移行が抑制されたと考えられる。軟膏適用後、一定時間が経過すると、角層除去起炎剤投与皮膚では、全血中 TL 濃度が角層除去皮膚よりも高い値となった。しかしながら、それにも関わらず、時間経過で皮膚中 TL 濃度に変化は観察されなかった。そのため、皮膚局所において TL とタンパク質との結合に飽和が生じたと考えられる。そして、全血中 TL 濃度が上昇していたことから、TL の遊離形分率は、その間増加していたと考えられる。皮膚局所における TL の効果は、その皮膚中濃度に依存するが、一般にその場合に重要であるのは、遊離形の濃度であると考えられている⁵⁹。炎症により皮膚組織中に血漿タンパク質が漏出した場合でも、遊離形薬物濃度の低下は適用初期だけであり、そのことが原因で薬効が減少するとは考えにくい。TL の皮膚への適用は、皮膚局所のみならず皮膚所属リンパ節に存在する免疫担当細胞の分化能および抗原提示細胞の抗原提示能を低下させることが報告されている⁶⁰。炎症皮膚内には、タンパク質と結合している TL が高濃度で存在している。時間経過に伴ってタンパク結合した TL が周辺組織の所属リンパ節に取り込まれ、マクロファージや樹状細胞、好中球といった食細胞に貪食されることで、抗炎症作用に寄与することも考えられる。このようなことから、皮膚局所の浮腫が TL の薬効とどう関わるかについては、さらに検討していく必要があると考えられる。

第 3 章 アトピー性皮膚炎モデルマウスにおけるタクロリムス全身移行および皮膚中濃度に関する検討

第 1 章および第 2 章に亘って、人工的に調整した皮膚生理状態が異なるヘアレスラットの背部皮膚をモデル皮膚として用いることで、TL の全身移行および皮膚局所移行に影響を及ぼす要因を調査してきた。その結果から、以下の要因が挙げられる。

要因		－	起こり得る変化
1)	角層バリア障害	－	血中濃度の増大 皮膚中濃度の増大
2)	皮膚血流量上昇	－	血中濃度の増大 皮膚中濃度の低下
3)	血管透過性亢進	－	血中濃度の増大 皮膚中濃度の低下
4)	血漿タンパク質の血管外漏出	－	血中濃度の低下 皮膚中濃度の増大

そこで、AD 様皮膚病変を呈する AD モデルマウスを用いて、TL 皮膚適用後の全血中および皮膚中 TL 濃度を測定することで、AD 患者で起こり得る TL の全身および皮膚局所移行動態について考察した。さらに、AD モデルの皮膚状態に合わせて、全身移行の回避を志向した軟膏の適用を試み、その際の TL の全身移行性および皮膚局所滞留性を評価した。まず、第 1 節では、作成した AD モデルマウスの皮膚状態、すなわち TEWL および PU を測定し、両パラメーターと TL の全身移行性の関係性を評価した。第 2 節では、軟膏の希釈による TL 全身移行の制御を試み、その時の皮膚中 TL 濃度への影響を調査した。第 3 節では、血管収縮剤としてアドレナリンを軟膏に混合し、その効果を検証するために、血中および皮膚中 TL 濃度への影響を調査した。

第 1 節 アトピー性皮膚炎モデルマウスにおけるタクロリムス全身移行性の評価

モデル動物には、AD モデルマウスとして汎用されている NC/Nga マウスを使用し⁶¹、ダニ抗原の抽出物 (*dermatophagoides farinae* extract, Dfe) を反復塗布することでアトピー様症状を誘発した^{62,63}。AD の誘発に際し、4^w/v%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液により、背部および耳介部の皮膚バリア能を低下させ、同じ箇所にはダニ抗原含有親水ワセリン 100mg/匹/回を週 2 回、3 週間 (計 6 回) 塗布した。*In vivo* 経皮吸収試験には、ダニ抗原塗布開始 21 日および 29 日後のマウスを供した。ダニ抗原塗布開始後から経皮吸収試験実施日までの背部皮膚および耳介の肉眼的所見を観察し、皮膚炎の重症度を評価した。重症度のスコアリングは、1) 発赤・出血、2) 乾燥・痂皮形成、3) 耳介の浮腫、4) 耳介部の擦傷・組織欠損、をそれぞれ無症状 0 点、軽度 1 点、中症度 2 点、重症度 3 点として、その合計を皮膚炎スコアとした⁶⁴。スコアリングと同時に耳介部の厚み、背部皮膚の TEWL および PU を測定した。AD モデルマウス作成時におけるそれぞれの時間推移を Fig. 16A, B, C および D に示す。

皮膚炎スコアは、ダニ抗原塗布開始後 21 日まで増加したが、29 日で半減し、皮膚炎からの回復傾向が観察された。耳介厚は 21 日まで上昇し、29 日で変わらず、耳介の浮腫は維持された。一方、TEWL は正常皮膚 11.1 ± 2.4 (g/m²/h) から、ダニ抗原最終塗布 17 日で最大値 39.3 ± 7.4 (g/m²/h) を示した後、21 日 31.0 ± 9.6 (g/m²/h)、29 日 16.9 ± 6.2 (g/m²/h) と低下し、29 日においては、正常値と有意な差は見られなかった。PU は正常皮膚 101 ± 19 から、ダニ抗原塗布 10 日で最大値 188 ± 102 を示した後、ダニ抗原塗布 14 日で低下を示し、正常値と有意な差は見られなかった。その後、21 日に有意な上昇 (167 ± 80) が観察されたが、29 日で 111 ± 28 を示し、正常値と比べて有意な差は見られなかった。

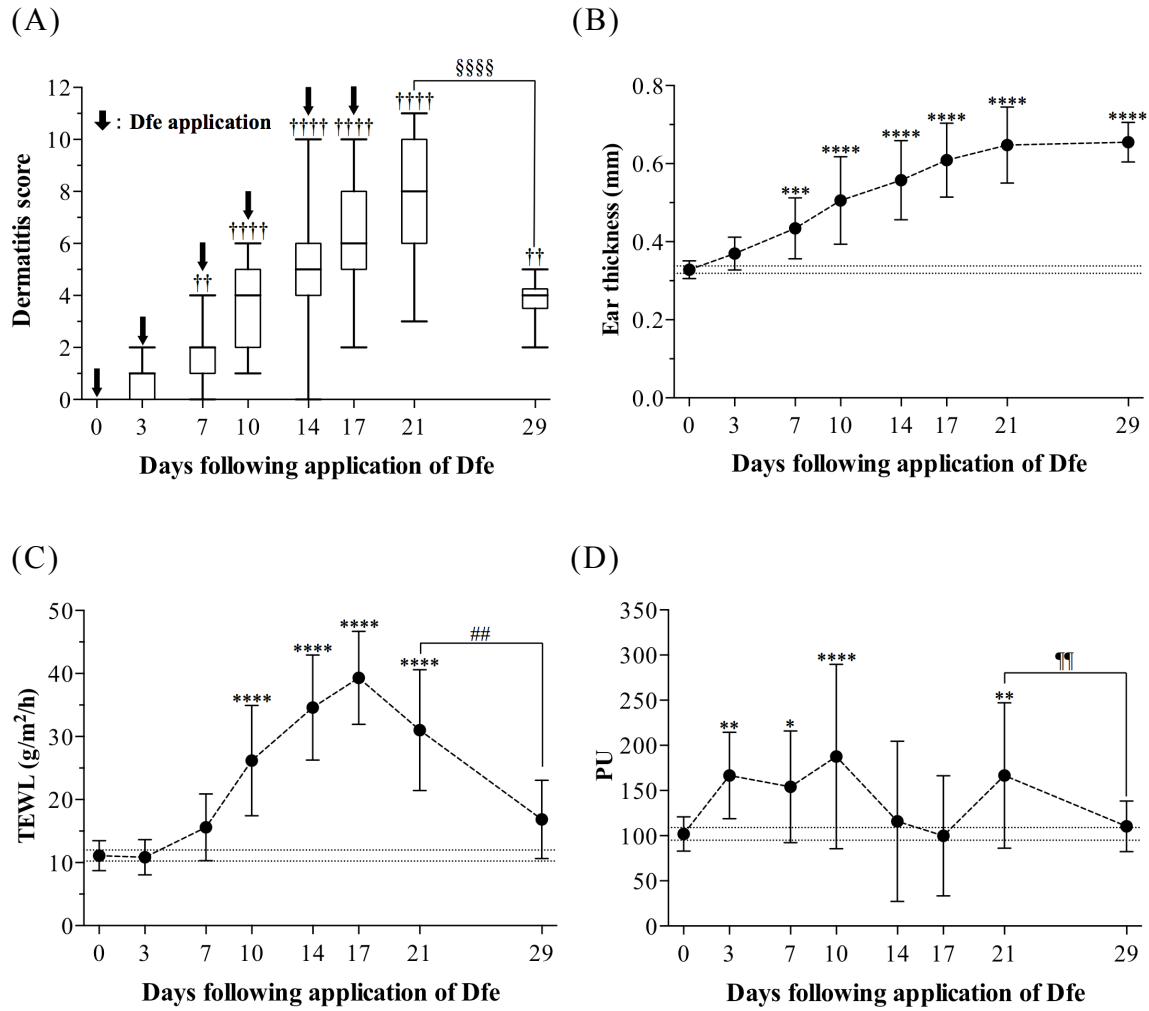


Fig. 16 Dermatitis score (A), ear thickness (B) and physiological skin conditions (C: TEWL, D: PU) during preparation of AD model mice.

Box plots of dermatitis score (A) show median and interquartile range; whiskers show the highest and lowest values. Ear thickness (B) is expressed as mean of both ears. The dashed lines in (B, C and D) show the 95% confidence interval. Each value is expressed as mean \pm SD ($n = 6, 25, 31$). $^{\dagger\dagger}P < 0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.001$, the Dunn's test following the Kruskal-Wallis test; $^{\S\S\S\S}P < 0.001$, the Mann-Whitney U test. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.005$, $^{****}P < 0.001$, the Dunnett's test following ANOVA; $^{##}P < 0.01$, unpaired t test; $^{\P\P}P < 0.01$, the Welch's t test.

ダニ抗原塗布開始 21 日および 29 日経過後のマウス背部皮膚に 0.1^w/_w% TL 軟膏を単純塗布 (適用面積 0.79cm², 軟膏適用量 8 mg/body) した。経皮吸収試験 2 時間の AUC_{PU} を Fig. 17A に、1 点採血により得た TL 軟膏適用 2 時間後の全血中 TL 濃度と TEWL もしくは AUC_{PU} の関係をそれぞれ Fig. 17B および C に示す。

AUC_{PU} 値は、AD マウス 21 日群と 29 日群の間で有意な差は観察されなかった ($P = 0.128$)。両群の TL 軟膏適用 2 時間後の全血中 TL 濃度と TEWL の間に正の相関関係が観察された ($r = 0.932$, $P < 0.0001$)。一方で、全血中 TL 濃度と AUC_{PU} との間は、無相関であった ($r = -0.151$, $P = 0.590$)。これらのことから、本研究で使用した AD マウスにおいて、TL の全身移行性は角層バリア能に強く影響を受けることが示唆された。

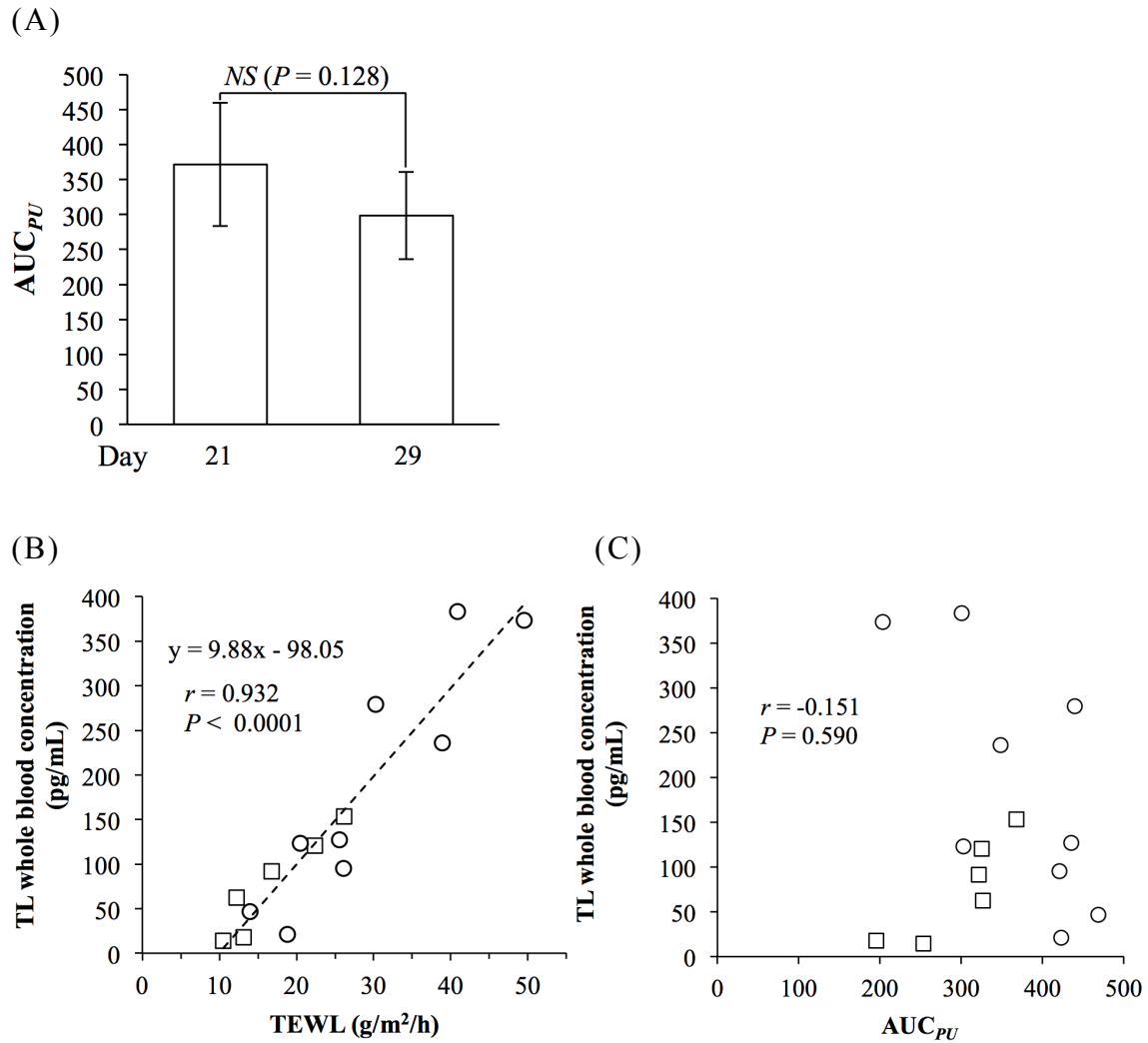


Fig. 17 AUC_{PU} during absorption study (A); relationship between skin barrier function and TL whole blood concentration 2 h (B) and relationship between skin blood flow and TL whole blood concentration 2 h (C) following application of 0.1^w/_w% TL ointment (8 mg/body).

AUC_{PU} values in (A) were represented as mean \pm SD ($n = 6, 9$), non-significant (NS) difference between two groups, unpaired t test. Symbols in (B) and (C): \circ - 21 days following first application of Dfe; \square - 29 days following first application of Dfe. The solid line in (B) shows the regression curve for all data. The r and P values were calculated using the Pearson test.

第 2 節 タクロリムスの全身移行の制御を目的とした希釈軟膏の適用

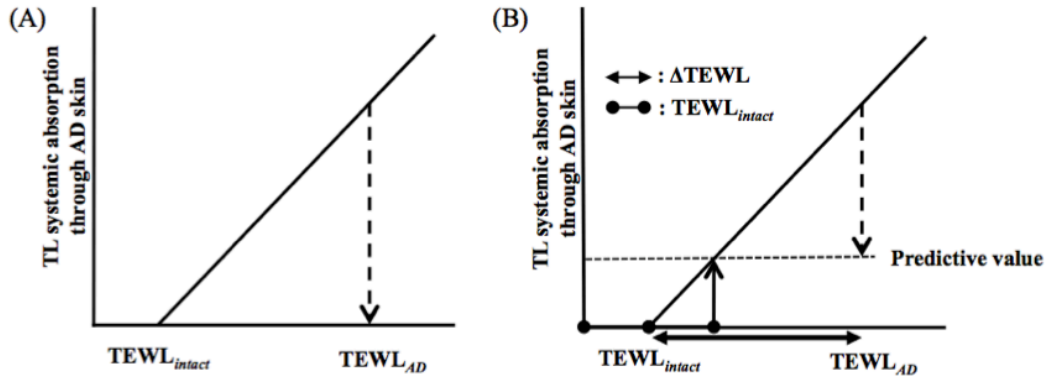
第 1 節では、アトピー様皮膚病変を有するマウス背部皮膚において、TL の全身移行量が角層バリア能に依存することを明らかにした。そこで、第 2 節では、AD マウス皮膚の TEWL に応じて TL 軟膏の希釈を行い、予測される TL 全身移行量が得られるか検討した。さらに、希釈による皮膚中 TL 濃度への影響を評価するために、試験終了後に皮膚から TL を抽出した。経皮吸収試験には、皮膚炎スコアが上昇し、TEWL も正常値より有意に高かったダニ抗原塗布開始 21 日後のマウスを供した。0.1% TL 軟膏の希釈には、流動パラフィンを用いた。希釈倍率は (4) 式から算出し、その希釈倍率より予想される TL 吸収量の変化を TEWL もしくは軟膏中 TL 濃度と TL 吸収量の関係の模式図として Fig. 18 に示す。TEWL が正常値を示すとき TL が全身に吸収されないと仮定すれば、TEWL 値と TL 全身移行量が比例関係にあることから (Fig. 17B)、AD マウスの TEWL ($TEWL_{AD}$) と正常マウスの TEWL ($TEWL_{intact}$) 値の比を希釈倍率とすることで全身移行を完全に回避できると予想される。本検討では、希釈による全身移行量の制御が可能であるか調査するために、TEWL の増加率を希釈倍率とした。すなわち、適用軟膏中 TL 濃度を $TEWL_{intact}$ 値からの増加分 ($\Delta TEWL$) で除したのち $TEWL_{intact}$ 値を掛けるので、 $TEWL_{intact}$ 値の 2 倍値の TEWL 値を有する皮膚からの TL 吸収量と一致すると予想される。

$$Dilution\ rate = \frac{TEWL_{AD} - TEWL_{intact}}{TEWL_{intact}} = \frac{\Delta TEWL}{TEWL_{intact}} \quad \dots (4)$$

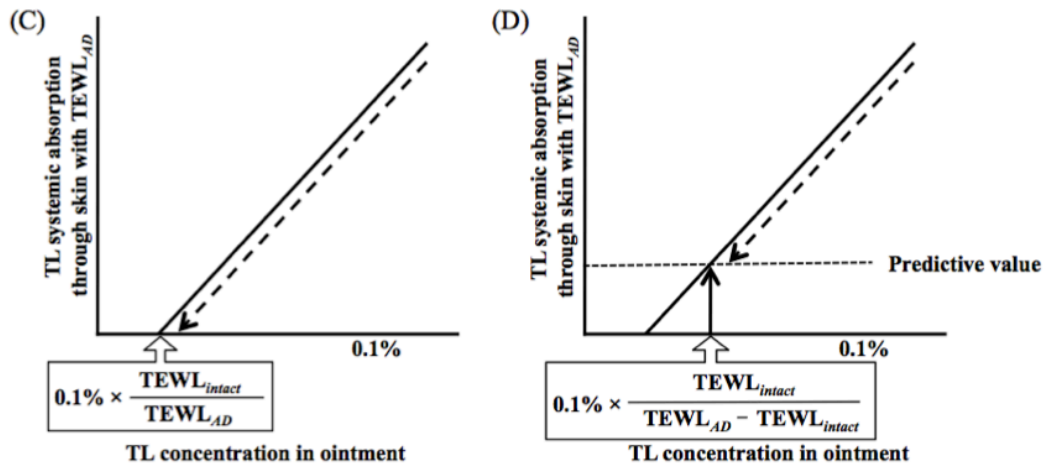
$$\text{Dilution rate} = \frac{\text{TEWL}_{AD}}{\text{TEWL}_{intact}}$$

$$\text{Dilution rate} = \frac{\text{TEWL}_{AD} - \text{TEWL}_{intact}}{\text{TEWL}_{intact}}$$

TEWL – TL systemic absorption



TL concentration in ointment – TL systemic absorption



↓ : A decrease in TL systemic absorption by dilution

↑ : TL systemic absorption through skin with ΔTEWL value being equal to TEWL_{intact} value

Fig. 18 Schematic diagram of a decrease in TL systemic absorption by dilution of TL ointment using two types of dilution rates

吸収試験前（ダニ抗原塗布開始 21 日後）の $TEWL_{AD}$ とダニ抗原塗布開始日の $TEWL_{intact}$ の差である $\Delta TEWL$ を $TEWL_{intact}$ で除し、各 AD マウスに適用する軟膏の希釈倍率を計算した。マウス個々の $TEWL_{AD}$ および希釈倍率、希釈後の軟膏中 TL 濃度を Table 4 に示す。

Table 4 Dilution rate according to the $TEWL_{AD}$ values of each AD mice skin and the TL concentration in the ointment diluted with liquid paraffin.

Mouse #	$TEWL_{AD}$ (g/m ² /h)	Dilution rate	TEWL before TL application (g/m ² /h)	TL concentration in the ointment diluted (^w / _w %)
1	39.6	¹ 2.39	36.9	0.0419
2	46.8	¹ 3.01	44.9	0.0333
3	40.9	¹ 2.50	43.6	0.0400
4	31.2	¹ 1.67	33.2	0.0599
5	23.7	² 1.15	22.8	0.0873
6	25.3	² 1.29	23.6	0.0775
7	26.5	² 1.40	26.9	0.0715

Dilution rates were calculated using the following two different values.

¹ $TEWL_{intact} = 11.6 \pm 2.1$ (mean \pm SD)

² $TEWL_{intact} = 11.1 \pm 2.4$ (mean \pm SD)

希釈倍率算出に用いた $TEWL_{intact}$ は、試験実施時点で測定済みの全マウスの $TEWL_{intact}$ の平均値とした。試験実施時点における測定検体数の違いから、 $TEWL_{intact}$ 値は異なる 2 つの値を採用したが、大きな違いはなかった。また、試験実施日、軟膏の希釈に時間を要するため、希釈倍率の算出に用いた $TEWL_{AD}$ と軟膏塗布直前の $TEWL$ の間でわずかな変動がみられたが、問題ないと判断した。

希釈軟膏を用いた経皮吸収試験は、マウス背部皮膚に単純塗布（適用面積 0.79 cm²，希釈軟膏適用量 8mg/body）により行った。希釈軟膏適用 2 時間後の全血中 TL 濃度と $TEWL_{AD}$ の関係を Fig. 19A および B に示す。Fig. 19B の血中濃度は TL 適用量で除すことで標準化して示す。

Fig. 19A の回帰式 (TL whole blood concentration = $10.702 \times TEWL_{AD} - 127.42$) より、 $TEWL_{intact}$ (11.1 ± 2.4 g/m²/h) の 2 倍値における全血中 TL 濃度は 109.09 (pg/mL) である。Fig. 19A の軟膏希釈適用群における

全血中 TL 濃度の平均値は、 85.50 ± 19.45 (pg/mL) であった。実測の全血中 TL 濃度は予測値よりも低い値となったが、希釈により確実に全身移行を抑制できることが確認された。全血中 TL 濃度を TL 適用量で除して標準化した場合、希釈軟膏適用群のデータは、回帰直線に一致しないものもあり、直線より下にシフトする傾向が観察された。

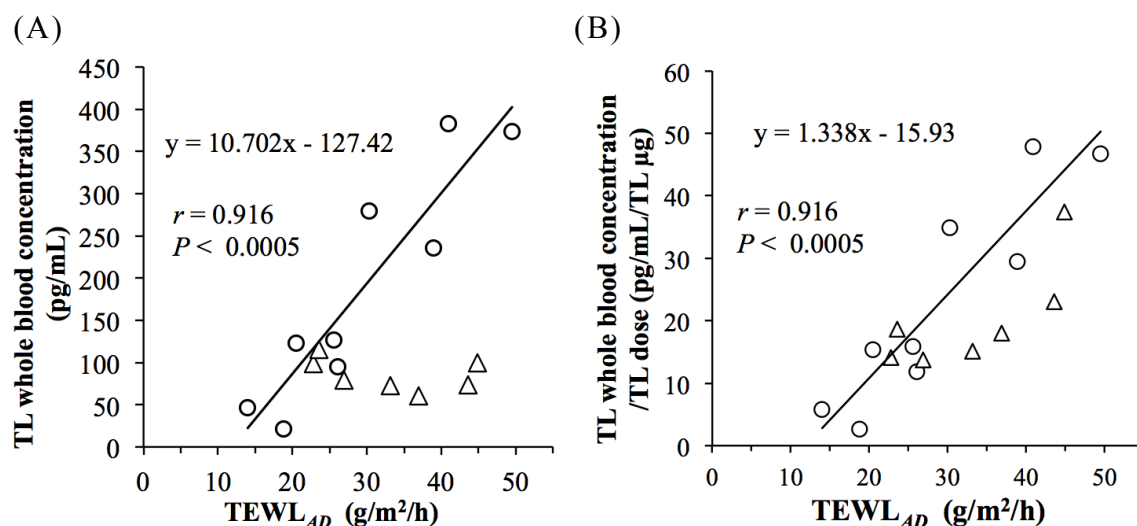


Fig. 19 Relationship between skin barrier function and TL whole blood concentration 2h following application of 0.1% or diluted TL ointment (8 mg/body) on AD mice skin (0.79 cm²).

Symbols: ○ - 0.1% TL ointment; △ - TL ointment diluted with liquid paraffin according to TEWL_{AD}. The solid lines in (A and B) show the regression curve for 0.1% TL ointment. The r and P values were calculated using the Pearson test.

試験終了 2 時間後に摘出した背部皮膚をハサミで細断し、アセトニトリルに浸漬させて TL の抽出を行った。Fig. 20 に、摘出皮膚重量あたりの TL 抽出量と TL 全血中濃度の関係を示す。

TL の全血中濃度は皮膚中濃度に依存することが観察されたが、皮膚中 TL 濃度 15 (ng/skin mg) を境にして、2 相性を示した。すなわち、皮膚中 TL 濃度が高値を示す時に全血中 TL 濃度が急上昇すると捉えることもできる。

本検討に使用した AD マウスは、ダニ抗原塗布開始後、耳介厚の上昇が継続して認められたことから、血管透過性の亢進による浮腫が持続的に生じていると考えられた。したがって、第 2 章 2 節で観察されたように、皮膚局所滞留性と漏出タンパク質の関係を本 AD マウスにおいても考察していく必要があると考えられた。

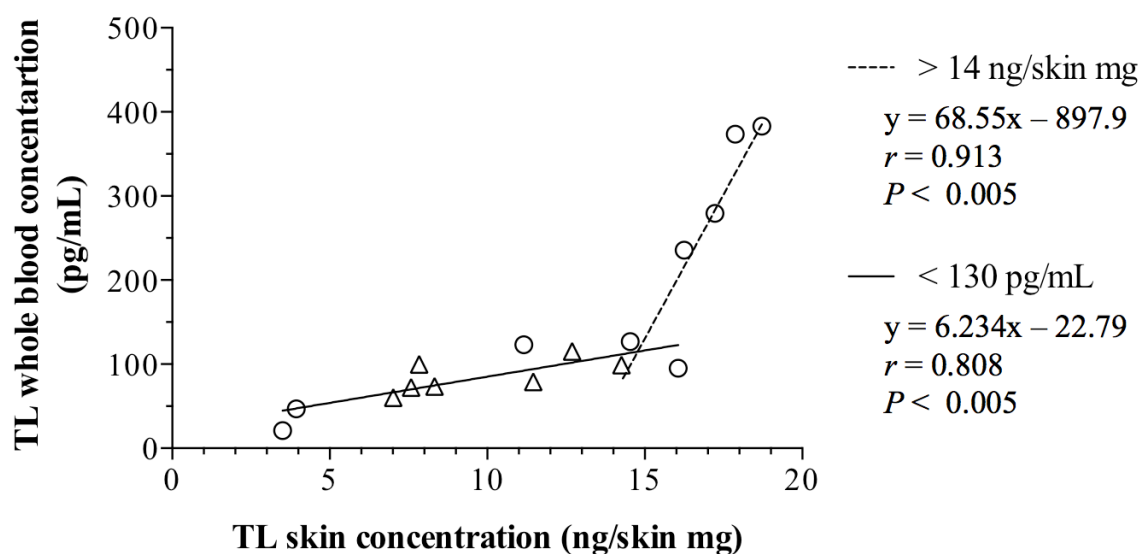


Fig. 20 Relationship between TL skin concentration and TL whole blood concentration 2h following application of 0.1% or diluted TL ointment (8 mg/body) on AD mice skin (0.79 cm²).

Symbols: ○- 0.1% TL ointment; △- TL ointment diluted with liquid paraffin. The solid line shows the regression curve for the data (TL whole blood concentration < 130 pg/mL, n = 12). The dashed line shows the regression curve for the data (TL skin concentration > 14 ng/skin mg, n = 7). The r and P values were calculated using the Pearson test.

第 3 節 より安全なタクロリムス軟膏の使用を志向した血管収縮剤併用皮膚適用の効果の検証

本節では、AD モデルマウスにおいて、アドレナリン併用皮膚適用の効果を検討した。

経皮吸収試験に使用した AD モデルマウスは、ダニ抗原塗布開始 21 日経過のマウスとした。AD マウス背部皮膚にアドレナリンを 0.50^{w/w}% となるように混合した 0.1^{w/w}% TL 軟膏を単純塗布 (適用面積 0.79cm², 軟膏適用量 8 mg/body) した。経皮吸収試験 2 時間の AUC_{PU} を Fig. 21A に、TEWL もしくは AUC_{PU} と全血中 TL 濃度との関係をそれぞれ Fig. 21 B および C に示す。

アドレナリンの併用により、AUC_{PU} は有意に低下したが、Fig. 21B より、全血中 TL 濃度は TEWL と良好な相関を示し、Fig. 19A の回帰直線式によく一致した。さらに、全血中 TL 濃度と AUC_{PU} との間は、無相関であった ($r = -0.226$, $P = 0.480$)。アドレナリン併用の有無に関わらず TL 吸収量は角層バリア能に強く依存した。アドレナリンの混合適用群において、全体的に TEWL が低値を示した (TEWL の最小値-最大値: アドレナリン併用群 20.1-33.1 g/m²/h; TL 単独投与群 18.8-49.5 g/m²/h)。このことから、角層バリアが機能していたため、皮膚血流量の低下による TL 吸収量への影響が現れなかったことも考えられる。

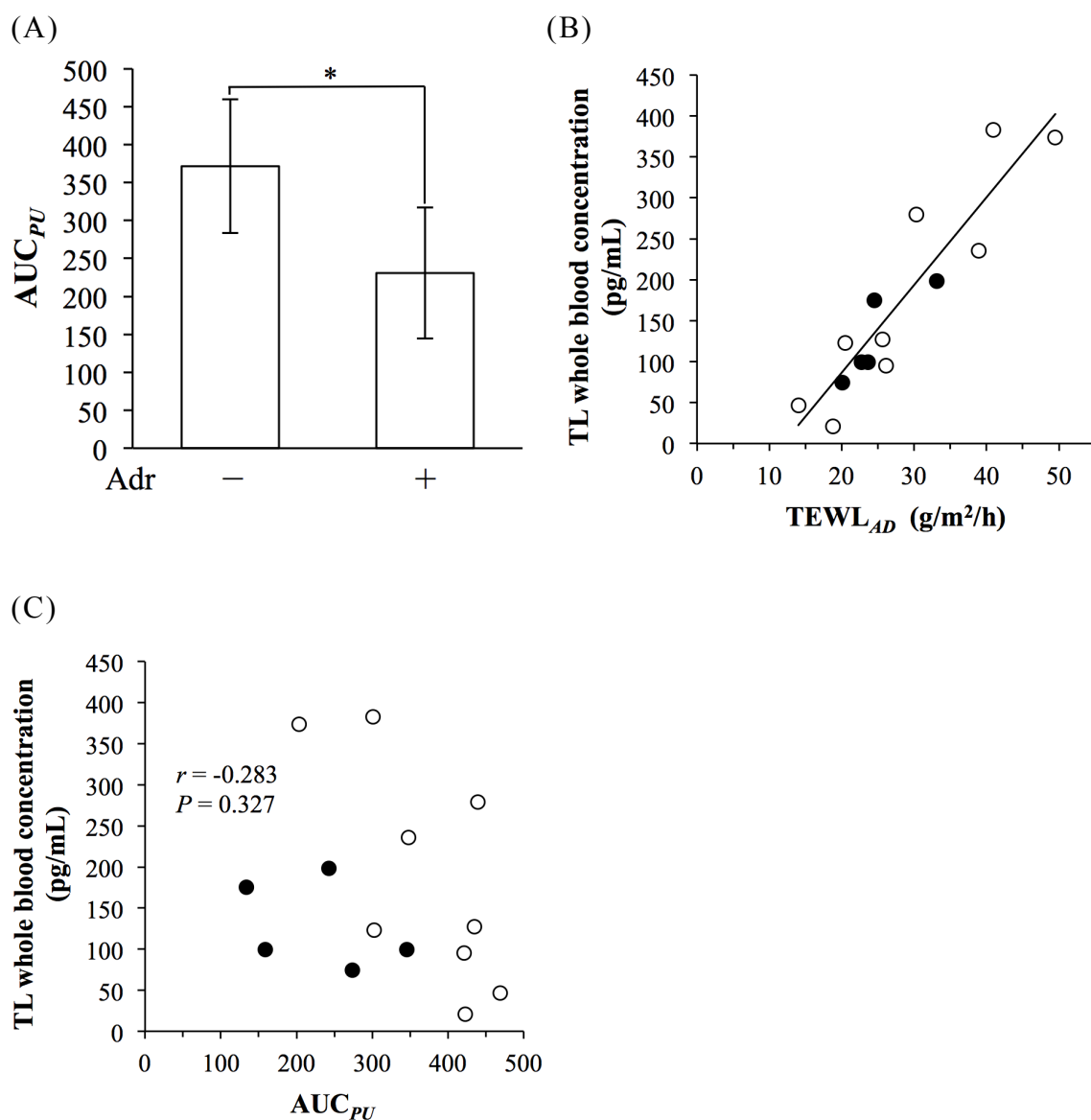


Fig. 21 AUC_{PU} during absorption study (A); relationship between skin barrier function and TL whole blood concentration 2 h (B) and relationship between skin blood flow and TL whole blood concentration 2 h (C) following application of 0.1% TL ointment (8 mg/body) with or without 0.50^w/_w% Adr on AD mice skin (0.79 cm²).

(A): 0.1% TL ointment (-) vs 0.1%TL + 0.50% Adr (+), * $P < 0.05$, unpaired t test. Symbols in (B and C): ○ - 0.1% TL ointment, ● - 0.1%TL + 0.50% Adr. The solid line in (B) is the regression curve for 0.1% TL in Fig. 19A. The r and P values were calculated using the Pearson test.

そこで、角層バリア能が障害され TEWL 値が高い個体において、アドレナリン併用による TL 全身吸収抑制の効果を再検証することとした。その際、TL の希釈軟膏と併用することで、アドレナリン併用および軟膏希釈の効果について、同時に検討した。第 2 章のヘアレスラット起炎剤投与皮膚の結果から、AD マウス皮膚においても、希釈軟膏の適用により TL の皮膚中濃度が低下するとタンパク結合に関係する影響が現れやすいと予測される。軟膏の希釈倍率は第 2 節と同様に (4) 式より算出した。Table 5 に各マウスの $TEWL_{AD}$ 値および希釈倍率、希釈後の軟膏中 TL 濃度を示す。

Table 5 Dilution rate according to the TEWL values of each AD mice skin and the TL concentration in the ointment diluted with liquid paraffin.

Mouse #	$TEWL_{AD}$ (g/m ² /h)	Dilution rate	TEWL before TL application (g/m ² /h)	TL concentration in the ointment diluted (^w / _w %)
1	45.2	2.87	44.1	0.0349
2	37.6	2.22	35.7	0.0451
3	40.1	2.43	41.9	0.0411

Dilution rates were calculated using the following $TEWL_{intact}$ value.

$$TEWL_{intact} = 11.6 \pm 2.1 \text{ (mean} \pm \text{SD)}$$

$TEWL_{AD}$ に応じて希釈した軟膏にアドレナリンを 0.50^w/_w% となるように混合し、ダニ抗原塗布開始 21 日経過後のマウス背部皮膚に単純塗布 (適用面積 0.79cm², 軟膏適用量 8 mg/body) した。経皮吸収試験 2 時間の AUC_{PU} を Fig. 22A に、全血中 TL 濃度もしくは TL 適用量で標準化した血中濃度と TEWL との関係を Fig. 22B および C に、そして全血中 TL 濃度と AUC_{PU} との関係を Fig. 22D に示す。

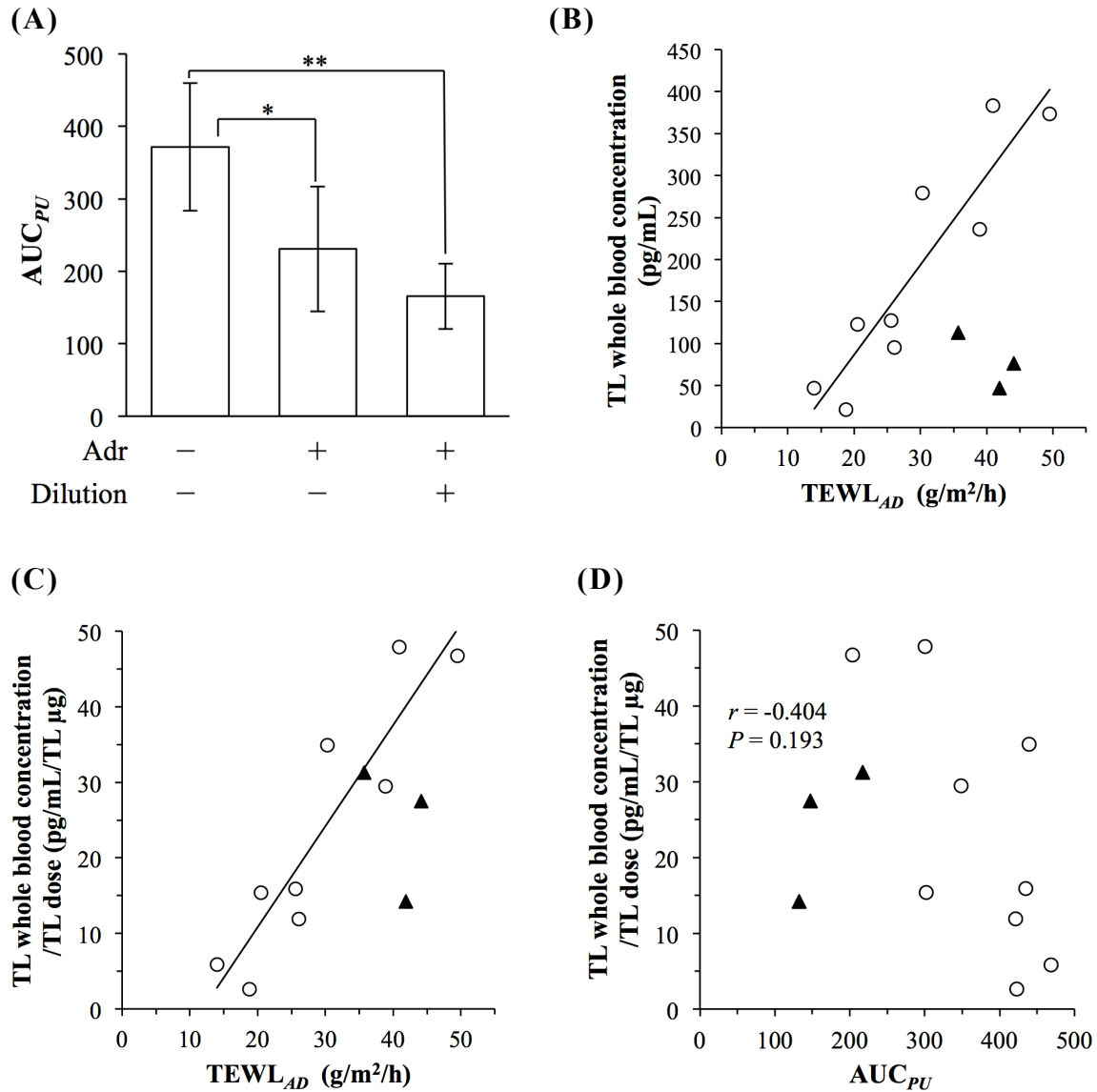


Fig. 22 AUC_{PU} during absorption study; (A), relationship between skin barrier function and TL whole blood concentration 2 h (B and C) and relationship between skin blood flow and TL whole blood concentration 2 h (D) following application of 0.1% TL ointment (8 mg/body) with or without 0.50^w/_w% Adr on AD mice skin (0.79 cm²).

(A): 0.1% TL ointment (-, -), 0.50% Adr-mixed TL ointment (+, -), 0.50% Adr-mixed TL ointment with dilution (+, +). Each value is the mean \pm SD (n = 3, 5, 7), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the Tukey-Kramer method following ANOVA. Symbols in (B and C, D): \circ - 0.1% TL ointment, \blacktriangle - 0.50% Adr-mixed TL ointment with dilution. The solid lines in (C and D) show the regression curve in Fig. 19 (A and B) for 0.1% TL ointment. The r and P values were calculated using the Pearson test.

希釈軟膏にアドレナリンを併用すると、希釈軟膏アドレナリン非併用時に比べて AUC_{PU} は有意に低い値を示し、先の試験の 0.1% TL 軟膏にアドレナリンを併用した時に比べて、 AUC_{PU} は低い傾向にあった (Fig. 22A)。TEWL_{AD} 値は、先の試験のマウス (20.1-33.1 g/m²/h) に比べると本検討のマウス (35.7-44.1 g/m²/h) で高かったことから、角層バリア能が障害されることでアドレナリンの角層透過抵抗が弱まり、血管収縮の効果が顕著に現れたと考えられた。アドレナリン併用希釈軟膏 3 例の全血中 TL 濃度の平均値は、78.71 ± 32.98 (pg/mL) であり、回帰式で予想される予測値 109.09 (pg/mL) よりも低い値となった。TL 適用量で標準化した場合のデータは、回帰直線上もしくは線の下にプロットされた。この挙動は、第 2 節で希釈軟膏適用時にも観察されたため、TL の吸収抑制に対するアドレナリンの効果とは断定できない。しかしながら、本検討の希釈軟膏アドレナリン併用群 3 例で、血流量の増大に伴う TL 全身移行量の上昇が観察された。

そこで、これまで検討したダニ抗原塗布開始 21 日経過後の AD マウス (24 例) において、全血中 TL 濃度に対する TEWL_{AD} および AUC_{PU} 値の影響を評価するために、TL 適用量で標準化した全血中 TL 濃度目的変数を、TEWL_{AD} および AUC_{PU} 値を説明変数として、重回帰分析を行った。さらに、TEWL_{AD} 値 30 (g/m²/h) を境に、それ以上の値を示した皮膚 (12 例) とそれ未満の皮膚 (12 例) の 2 群に分けて、同様に重回帰分析を行った。また、それらの結果をもとに、TEWL_{AD} および AUC_{PU} 値を説明変数とした場合の重回帰式の精度と、TEWL_{AD} 値のみ説明変数とした場合の単回帰式の精度を比較した。

重回帰分析で得られた回帰式の精度およびその妥当性の検定結果を Table 6 に、回帰係数とその検定結果を Table 7 に示す。

Table 6 Accuracy of regression equation by multiple regression analysis for TL whole blood concentration as response variable, TEWL_{AD} and AUC_{PU} value as explanatory variable, and by simple regression analysis for TL whole blood concentration as response variable and TEWL_{AD} value as explanatory variable.

— Multiple regression analysis —						
Group of AD mouse	<i>R</i>	<i>R</i> _{adj}	<i>R</i> ²	<i>R</i> ² _{adj}	<i>P</i> value	
ALL	0.776	0.752	0.603	0.565	< 0.001	****
TEWL _{AD} ≥ 30	0.799	0.746	0.638	0.557	0.010	*
30 > TEWL _{AD}	0.670	0.572	0.449	0.327	0.068	NS
— Simple regression analysis —						
Group of AD mouse	<i>R</i>	<i>R</i> _{adj}	<i>R</i> ²	<i>R</i> ² _{adj}	<i>P</i> value	
ALL	0.762	0.750	0.581	0.562	< 0.001	****
TEWL _{AD} ≥ 30	0.372	0.229	0.139	0.053	0.233	NS
30 > TEWL _{AD}	0.649	0.603	0.422	0.364	0.022	*

P* < 0.05, ***P* < 0.001, NS = non-significant for each regression model, *F* test.
R = multiple correlation coefficient; *R*_{adj} = adjusted *R*; *R*² = coefficient of determination; *R*²_{adj} = adjusted *R*²

Table 7 Partial regression coefficient of TEWL_{AD} and AUC_{PU}.

Group of AD mice	<i>n</i>	Explanatory variable	<i>B</i>	β	<i>P</i> value	
ALL	24	TEWL	1.036	0.857	< 0.001	****
		AUC _{PU}	0.014	0.175	0.297	NS
TEWL _{AD} ≥ 30	12	TEWL	1.387	0.712	0.011	*
		AUC _{PU}	0.098	0.784	0.007	**
30 > TEWL _{AD}	12	TEWL	0.948	0.657	0.026	*
		AUC _{PU}	-0.005	-0.167	0.517	NS

P* < 0.05, *P* < 0.01, *****P* < 0.001, NS = non-significant for *B* value, *t* test.
B = partial regression coefficient; β = standardised partial regression coefficient

目的変数を TL 適用量で標準化した全血中 TL 濃度、説明変数を $TEWL_{AD}$ および AUC_{PU} 値として重回帰分析を行った結果、ダニ抗原塗布開始 21 日経過後の AD マウス (24 例) における重回帰モデルは有意であり ($P < 0.001$)、その自由度調整済み決定係数 (調整 R^2) は、 $TEWL_{AD}$ 単独の単回帰モデルの調整 R^2 よりもわずかに高値を示した。さらに、その時の AUC_{PU} の偏回帰係数 (B) は、有意でなく ($P = 0.297$)、その標準化偏回帰係数 (β) は $TEWL_{AD}$ の β よりも小さかった。これらことから、TL 全身移行に対する皮膚血流量の影響は小さいと考えられた。

$TEWL_{AD}$ 値 $30 \text{ (g/m}^2\text{/h)}$ を境にして、高 $TEWL_{AD}$ 群で、単回帰モデルは有意でなく ($P = 0.233$)、一方で重回帰モデルは有意であった ($P = 0.010$)。それぞれの調整 R^2 を比較すると、重回帰モデルの方が高い値であった。 $TEWL_{AD}$ 値が $30 \text{ (g/m}^2\text{/h)}$ 未満である低 $TEWL$ 群においては単回帰モデルのみ有意であり ($P = 0.022$)、その時の調整 R^2 は重回帰モデルに比べわずかに高値を示した。また、低 $TEWL$ 群における AUC_{PU} の B の値が 0 近いことから皮膚血流は影響しないことが考えられた。一方で、高 $TEWL$ 群では、 AUC_{PU} の B は、有意であり ($P = 0.011$)、 $TEWL$ の β に比べて、 AUC_{PU} の β がわずかに高い値であった。このことから、角層バリア能の低下が進むと、TL の全身移行に対する皮膚血流量の影響が大きくなることが示唆された。そのような場合、アドレナリンの併用が TL 全身移行の回避に有用となる。

第 2 節の Fig. 19B において、0.1% TL 軟膏適用群で示された $TEWL_{AD}$ と TL の適用量で標準化した全血中 TL 濃度の回帰直線に対して、希釈軟膏群のデータが一致せず、7 例中 4 例で大きく下回っていた。第 2 節の吸収試験にて希釈軟膏を塗布した皮膚の $TEWL_{AD}$ 値は、回帰直線から大きく逸脱していた 4 例で $33.2\text{--}44.9 \text{ (g/m}^2\text{/h)}$ と高い値を示しており (Table 4)、TL 全身移行に対する皮膚血流の影響を受けやすい皮膚状態であったことが推察される。0.1% TL 軟膏を塗布した皮膚の AUC_{PU} 値 (371 ± 98) に比べて、希釈軟膏を塗布した皮膚の AUC_{PU} 値 (194 ± 26) は低い値を示していた。そのため、0.1% TL 軟膏群よりも皮膚血流が低く、さらに高 $TEWL_{AD}$ 値を示していた希釈軟膏群において、TL 適用量当りの TL 全身移行量が回帰直線よりも低い値となったと考えられた。

これまでの、0.1%軟膏、希釈軟膏およびアドレナリン併用希釈軟膏それぞれの皮膚中 TL 濃度と全血中 TL 濃度の関係を Fig. 23A に、TL の皮膚中および TL 適用量で標準化した血中濃度を Fig. 23B に示す。

TL の皮膚中濃度と血中濃度との関係は、第 2 節 Fig. 20 と同様に皮膚中 TL 濃度 15 (ng/skin mg) を境にして 2 相性を示した。Fig. 23B において、TL の適用量で標準化すると、それぞれのデータの位置関係は変化した。希釈軟膏とアドレナリン併用希釈軟膏群は、0.1%軟膏に比べて、全血中 TL 濃度が低く、かつ皮膚中濃度が高い傾向にあった。すなわち、TL 皮膚局所濃度の上昇に対して、血中への移行性が低く、皮膚組織滞留性が高いことが明らかとなった。このことは、浮腫が生じていると考えられる本検討のモデルマウスにおいて、血漿タンパク質と TL の結合により、皮膚滞留性が高まったことが考えられる。

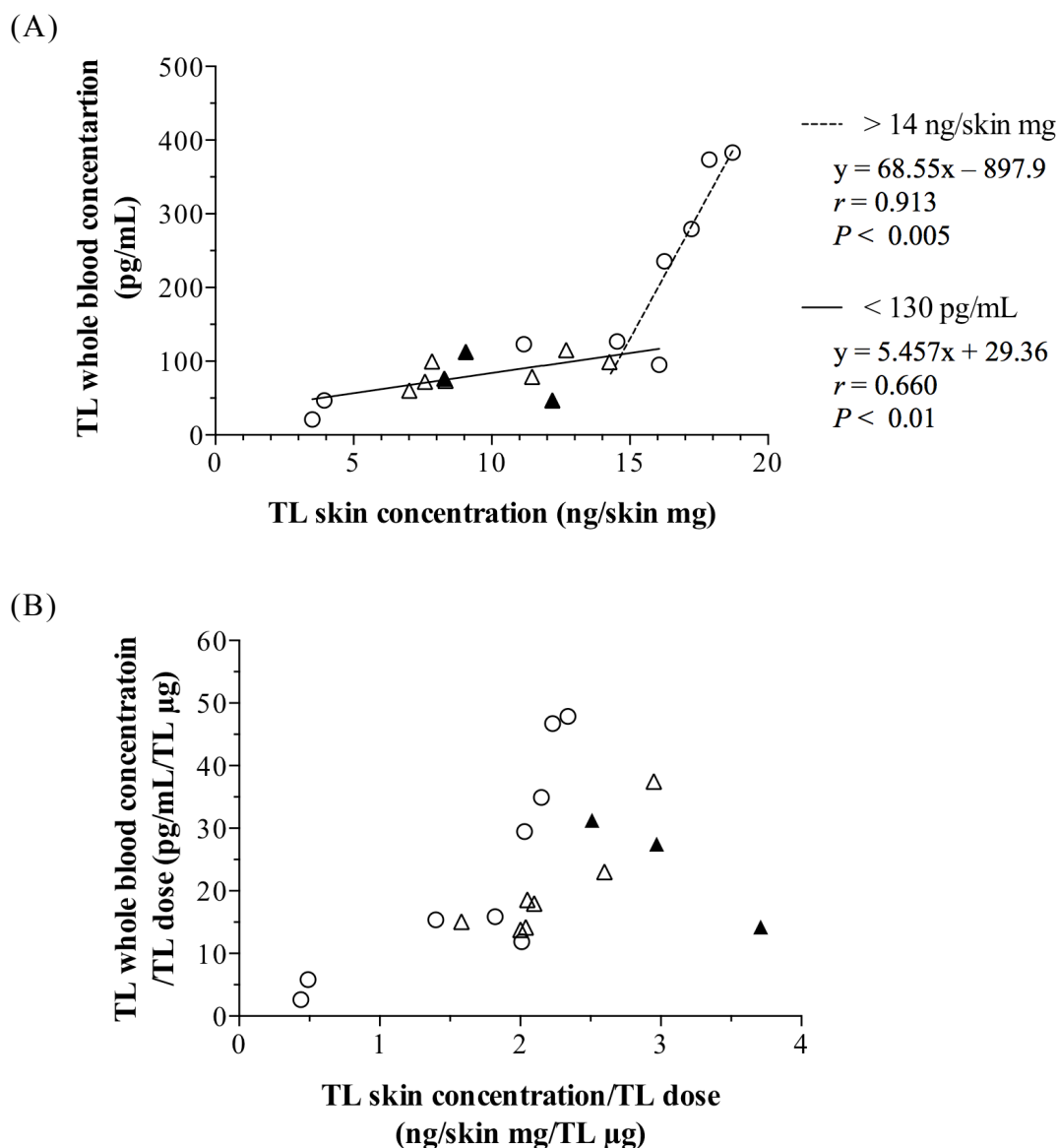


Fig. 23 Relationship between TL concentration in skin and TL whole blood concentration 2h following application of 0.1% TL ointment or liquid paraffin-diluted TL ointment with or without 0.50^w/_w% Adr on AD mice skin (0.79 cm²).

Symbols: ○ - 0.1% TL ointment, △ - TL ointment diluted with liquid paraffin according to TEWL, ▲ - 0.50% Adr-mixed TL ointment with liquid paraffin according to TEWL. The solid line shows the regression curve for the data (TL whole blood concentration < 130 pg/mL, n = 15). The dashed line shows the regression curve for the data (TL skin concentration > 14 ng/skin mg, n = 7). The r and P values were calculated using the Pearson test.

第 4 節 小括

第 1 節より、AD モデルマウスの皮膚は、TEWL、PU、耳介厚など炎症に関係するパラメーターはそれぞれ経日的変化が異なることが明らかとなった。ダニ抗原塗布開始後 21 日と 29 日経過のマウスを使用した TL 経皮吸収試験では、AD マウスの TL 軟膏皮膚適用 2 時間後の全血中 TL 濃度が TEWL と相関し、ヘアレスラットのモデルと同様に TL の全身移行性に対して角層バリア能が強く影響することが明らかになった。第 2 節では、TEWL に応じた希釈軟膏の塗布により得られた全血中 TL 濃度が、TEWL と TL 全身移行量の回帰式から算出された予測値よりいずれも低くなる傾向を示したが、TL の全身移行の回避は可能であることが確認された。また、皮膚中 TL 濃度と全血中濃度の関係は 2 相性であり、皮膚中 TL 濃度 15 ng/skin mg 以上で皮膚中濃度の上昇に対して、全血中濃度が著しく上昇したことから、TL とタンパク質の結合が飽和していることが考えられた。第 3 節において、希釈軟膏アドレナリン併用適用では、皮膚血流は有意な低下を示し、TL の全身移行が抑制される傾向が確認された。さらに、 $TEWL_{AD}$ 値が 30 ($g/m^2/h$) を超える、すなわち角層バリア能が重度に障害された皮膚では、TL の全身移行性に対する皮膚血流量の影響が強くなることが明らかとなった。そして、0.1%軟膏、希釈軟膏およびアドレナリン併用希釈軟膏それぞれについて全血中および皮膚中 TL 濃度の関係性を評価した結果、皮膚中对血中濃度比較において、希釈軟膏の適用およびアドレナリン併用による TL の皮膚滞留性の向上が観察された。浮腫の生じた皮膚に対する希釈軟膏の塗布では、血管外に漏出した血漿成分と TL が相互作用して TL の皮膚局所滞留性が高まることにより、全身移行が抑制されることが期待でき、また TEWL の上昇した皮膚では、アドレナリンの吸収が増大して血流抑制の効果が高まることで、比較的高い組織中濃度と低い血中濃度が得られると期待できると考えられた。皮膚局所への薬効に対するタンパク結合形 TL の寄与は明らかではないが、遊離形薬物と結合形薬物は平衡関係にあるため総薬物濃度の上昇は、薬効に直接寄与する遊離形薬物濃度の増加を意味する。一方、結合形のリンパ移行も薬効に寄与する可能性もあり、AD マウスで観察された TL の全身移行と皮膚局所動態は、TL の安全で有効な治療法の確立において非常に重要な知見を与えるものと考えられる。

結論

タクロリムス (TL) の軟膏剤が上市されてから 15 年ほどが経過し、アトピー性皮膚炎 (AD) への短期および長期使用における有効性や安全性について、一定の研究結果が集積されてきた。その中には、TL 軟膏ヒト皮膚適用後の血中濃度や皮膚中濃度に関する研究結果も散見される。しかしながら、そのヒトを対象に行われたいずれの試験においても、皮疹の重症度は、乾燥や紅斑、浮腫、組織損傷といった肉眼的所見や、皮疹の面積によって、軽度 (mild) および中程度 (moderate)、重度 (severe) と大別されるにとどまり、TL 軟膏が適用された皮膚の生理状態に関して定量的に評価した報告はない。薬物の皮膚適用後の皮膚内動態は、適用部位である皮膚の生理状態に大きく左右されることから、TL 軟膏の適用部位となる AD 患者の皮膚では複合的に生じる様々な炎症反応が、TL の皮膚内動態に複雑な影響を及ぼすことが考えられる。すなわち、薬物の皮膚局所濃度や血中濃度が、その皮膚病変部の生理状態により変動することは、薬物の有効性や安全性の評価を難しくする。そこで本研究では、実験動物モデルを用いて、皮膚病変部における TL の皮膚適用後の全身移行動態や皮膚局所移行動態特性を解析することで、それに影響を及ぼす要因について考察を行った。

以下に本研究により得られた知見について要約する。

第 1 章では、TL 移行動態に影響を及ぼすと考えられる炎症皮膚で生じる種々生理状態の変化を素過程に分離評価するため、ヘアレスラット背部皮膚の皮膚生理状態を変化させた種々皮膚モデルを作成し、TL 全身移行性を評価した。その結果、ラット正常皮膚からは TL は全身循環に吸収されにくく、角層バリア能を低下させると、それに依存して TL の全身移行量が増加した。さらに、ラット角層除去皮膚において、TL の全身移行は、基本的な経皮吸収理論に従うことを明らかにした。すなわち、AD 患者では、角層バリア能の低下に伴って TL 全身移行の増加が生じていると考えられ、その TL 全身移行量の予測には、TEWL の測定を行い、その TEWL に応じた軟膏の希釈が有効である。また、ラット皮膚への起炎剤投与により、皮膚浮腫が形成され、角層を除去した浮腫皮膚では、TL の全身移行量が増大した。この全身移行量は、起炎剤非投与群で観察された TL 全身移行量と血流の正の相関関係よりも高い値となった。これらのことから、TL の全身移行量の増加は、血管透過性の亢進と血流の増大の両方による影響と考

えられる。AD 患者でも、血流量の増加や血管透過性の亢進が生じている患者では、TL の全身移行の増加に注意が必要であり、血管収縮剤の併用により、血流量を低下させることで、TL 全身移行の抑制が期待できると考えられる。

第 2 章では、ヘアレスラット角層除去背部皮膚で、TL の全身および皮膚局所移行動態に対する血管外漏出タンパク質の影響を評価した。その結果、TL の全身移行回避を目的とした希釈軟膏の適用において、浮腫を有する角層除去皮膚では、浮腫がない皮膚に比べ、軟膏適用直後に TL の吸収の遅延が観察された。その皮膚中 TL 濃度を測定すると、浮腫皮膚において、有意に高い値となったことから、血管外に漏出した血漿タンパク質に TL が結合することで、皮膚局所に滞留したと考えられる。皮膚中における遊離形および結合形 TL のそれぞれの動態特性や、結合形 TL の薬効への寄与については、今後の検討が必要と思われる。

第 3 章では、AD モデルマウスを用いて、軟膏適用後の全血および皮膚中 TL 濃度を測定することで、AD 患者で起こり得る全身移行動態や皮膚局所移行動態特性を考察した。さらに、全身移行の制御もしくは回避を目指した軟膏の希釈や血管収縮剤の併用の効果の検証を行い、その時の動態特性を解析した。今回用いたダニ抗原塗布 21 および 29 日経過後のモデルは、角層バリア能が低下しているおり、21 日で血流は高値を示す一方で、29 日で正常値を示した。さらに両経過日数のモデルで耳介の肥厚が持続していたことから、持続的に浮腫が生じているモデルであった。0.1% TL 軟膏を適用した場合、その全身移行量は角層バリア能と良い相関性を示し、第 1 章で示した軟膏の希釈が有効と判断された。そこで、角層バリア能に応じた軟膏の希釈を行った結果、血中濃度の実測値は予測値よりも低い値であったが、軟膏の希釈が全身移行の抑制に有効であることが示された。血管収縮剤を併用した場合、TL の血中濃度は、角層バリア能が低下したマウスにおいては、低い値を示す傾向にあった。また、希釈軟膏とともに血管収縮剤を併用すると、血中濃度の抑制効果が認められた。血中濃度と皮膚中濃度の関係は 2 相性を示し、ある皮膚中濃度以上で皮膚中に漏出した血漿成分との結合が飽和することが示唆された。軟膏の希釈およびアドレナリンの併用は、より低い血中濃度/皮膚中濃度比が期待できることが

明らかとなり、より有効で安全な治療を考慮する上で有効な方法になるものと考えられた。

以上の結果より、AD 患者の皮膚病変部では、1) 角層バリア能の低下による TL 血中移行の増大、2) 皮膚血流量の上昇および血管透過性亢進による TL 血中移行の増大、3) 血管外漏出血漿タンパク質との結合による皮膚局所滞留性の増大が生じていることが考えられる。

本研究では、TL 経皮適用後の全身移行および皮膚局所動態が、皮膚の状態により様々に変化することを明らかにした。特に、角層バリア能の変化により TL の全身移行性が強く依存することから、経皮水分蒸散量の測定による皮膚病変部におけるバリア能の評価が有用となる。加えて、経皮水分蒸散量の測定は医療従事者が容易に実施できることから、その皮膚バリア能に応じて薬剤師が軟膏の希釈や血管収縮剤の併用といった薬学的管理のもと、より安全な薬物療法を提供できると考える。

謝 辞

本論文を終えるにあたり、経済的にも精神的にも支えてくれた家族に感謝の意を申し上げます。研究活動が朝早く、また夜遅い時間になっても、母の美味しく温かい手料理があったおかげで、心身ともに充実した研究生活を送ることができました。また、学業・研究に関して、一切口を出さずに、「自分の好きなようにやりなさい」と日頃から背中を押してくれた父には、何事にも躊躇せずに最初の一步踏み出す勇気もらいました。

実験の部

第 1 章

1. 実験材料

プロトピック[®] 軟膏 0.1%および 0.03%は、マルホ株式会社 (大阪) から購入した。アスコマイシンは A.G. Scientific, Inc. (San Diego) から購入した。カルバミド酸エチル、流動パラフィン、エバンスブルー (EB)、ギ酸、 λ -カラギーナン、ザイモサンおよびカゼインは和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。L-アドレナリンは、東京化成工業株式会社 (東京) から購入した。酢酸アンモニウムは、シグマ アルドリッチ ジャパン (東京) から購入した。カルボキシメチルセルロース (CMC Daicel 1170, 500-800 mPa·s, 25°C) は株式会社ダイセル (大阪) から購入した。マイクロダイアリシスプローブ (OP-100-10) は株式会社エイコム (東京) から購入した。日本薬局方滅菌ガーゼ タイプ III K-Pine は、川本繻帯材料株式会社 (東京) から購入した。その他の試薬は、全て市販の特級品を用い精製せずにそのまま用いた。

2. 動物 (ヘアレスラット)

すべての動物実験は、城西大学実験動物規定に沿って計画し、全学実験動物管理委員会の承認を得て実施した (承認番号: H27040 -April 8, 2015)。雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht、9-10 週齢、体重 200-300 g) は、城西大学生命科学センター (埼玉) から購入した。ラットは、室内環境がコントロールされ、自由摂食下、12 時間の明暗周期で、実験に使用されるまで適切に飼育された。本章のすべての動物実験では、5%イソフルランの吸入により麻酔導入し、その後、ウレタン溶液 (カルバミド酸エチル 1.5 g/kg) の腹腔内投与により麻酔した。

3. *In vivo* ヘアレスラット皮膚における TL 経皮吸収試験

実験室内環境を、 $25.5 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 40-60%にコントロールした。雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht 系、8-10 週齢) を 5%イソフルラン吸入麻酔により麻酔導入し、その後、ウレタン溶液 (カルバミド酸エチル 1.5 g/kg) の腹腔内投与により麻酔した。背部皮膚の毛を、電気シェーバーにより除毛した。試験に供した皮膚は、正常皮膚、正常角層起炎剤投与皮膚、テープストリッピング処理調整皮膚、角層除去皮膚、

血管収縮剤投与皮膚、角層除去起炎剤投与皮膚とした。それぞれの作成方法は後述する。タクロリムス (TL) 軟膏剤の塗布量は、 10 mg/cm^2 とし、実験操作の利便性を考えて密封塗布法により背部に投与とした。密封塗布は、ポリエチレン製のフィルムで塗布部を覆い、フィルムが剥がれないように適用部の周りを粘着テープにて固定した。軟膏の密封塗布後、頸静脈よりヘパリンで前処理した注射筒を用いて経時的に $100 \mu\text{L}$ の採血を行った。

4. 皮膚生理状態の評価

皮膚生理状態を評価するため、軟膏適用部位において、軟膏塗布直前に皮膚バリア能の指標である経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定した。測定機器には閉鎖型ポータブル水分蒸散計 VapoMeter[®] (Delfin Technologies Ltd, Kuopio, Finland) を使用した。また、同様に軟膏適用部位において、軟膏塗布前および軟膏密封塗布後、採血時に血流値 (PU) の測定を行った。測定機器には非接触型レーザードップラー血流画像化装置 PeriScan PIMIII[®] (PRIMED Ltd, Stockholm, Sweden) を使用した。

5. LC-MS/MS に向けた血液サンプル処理 (溶血・除タンパク・濃縮処理)

血液中の TL の 85%以上は赤血球画分に分布するため⁶⁵、個体間での赤血球数の変動による影響を排除するため、全血中における TL 濃度の測定を行った。すなわち、血液 $100 \mu\text{L}$ に、溶血の目的で 0.1M 硫酸亜鉛溶液とメタノールを 3 対 7 で混和した溶液 $150 \mu\text{L}$ を添加し、ボルテックスミキサーにて 10 秒間激しく攪拌した。さらに、攪拌後のサンプルに除タンパクおよび LC-MS/MS 測定時の標準物質添加の目的で、アスコマイシン (Asc) が 10 ng/mL で溶解したアセトニトリル溶液 (以下、内標準溶液とする) $250 \mu\text{L}$ を添加し、ボルテックスミキサーで 30 秒間激しく攪拌し、10 分間室温で静置させた。サンプルを遠心分離 (25°C , $14,000 \text{ rpm}$, 10 min) した後の上清 $450 \mu\text{L}$ を LC-MS/MS にて定量するまで -80°C で保存した。解凍後のサンプルを遠心濃縮装置 SpeedVac 2010 (Thermo Fisher Scientific Inc., Yokohama, Japan) にて濃縮 (45°C , 800 rpm , 2 h , 5.1 Torr) した。乾燥固化したサンプルに移動溶液を $70 \mu\text{L}$ 添加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間激しく攪拌した後に、遠心分離 (25°C , $14,000 \text{ rpm}$, 5 min) し、その上清 $50 \mu\text{L}$ を LC-MS/MS にて測定した。

6. LC-MS/MS による TL 測定条件

TL は LC-MS/MS 装置を用いて定量した。用いた LC-MS/MS は、LC ポンプ (LC-20AC, Shimadzu, Kyoto, Japan)、オートインジェクター (SIL-20AC HT, Shimadzu, Kyoto, Japan)、分離カラム (Hypersil GOLD CN, 150 mm×2.1 mm, Thermo Fisher Scientific Inc., Yokohama, Japan)、カラムオーブン (CTO-20AC, Shimadzu, Kyoto, Japan)、MS 分析器 (4000QTRAP[®] System, AB SCIEX, Tokyo, Japan) からなる。分離条件を Table S1 に示し、4000QTRAP[®] System の測定条件を Table S2 に示す。TL の定量は、アンモニウム塩として検出される TL 分子 {822.3 (m/z)} の分解物 {769.3 (m/z)} の検出により行った。内標準物質の Asc の定量はアンモニウム塩として検出される Asc 分子 {810.3 (m/z)} の分解物 {757.3 (m/z)} の検出により行った。

Table S1 Chromatography conditions for qualitative analysis of tacrolimus using the LC-MS/MS system.

Mobile phase	ultra pure water : acetonitrile = 35 : 65 0.1 % w/w formic acid 2 mM ammonium acetate
Flow rate	0.2 mL/min
Autosampler temperature	20°C
Injection volume	10 µL
Column temperature	30°C

Table S2 Mass spectrometer conditions for qualitative analysis of tacrolimus using the LC-MS/MS system.

Ionization	electrospray ionization
Scan mode	selected reaction monitoring
Ion mode	positive
Curtain gas pressure	10 psi (nitrogen)
Collision gas pressure	8 psi (nitrogen)
Ion spray voltage	5500 V
Temperature	600°C
Ion source 1 gas pressure (nebulizer gas)	40 psi (nitrogen)
Ion source 2 gas pressure (heater gas)	70 psi (nitrogen)
Analysis software	Analyst [®] , version 1.4.2

7. TL 軟膏適用条件と TL 全身移行性の評価

TL 軟膏の適用条件として、TL 軟膏の適用面積と軟膏中の TL 含有濃度 ($w/w\%$) を変更することで、TL 全身移行性への影響を検討した。すなわち、TL 軟膏 0.1%を用いて、適用面積 (cm^2) を 0.79, 5.0, 10 とした。また、軟膏の適用面積を 5.0 cm^2 として、TL 含有濃度 ($w/w\%$) を 0.003 (流動パラフィンにて希釈), 0.030, 0.10 (ともに市販製剤) とした。適用部位の皮膚は、テープストリッピング処理 (20 回) を施した角層除去皮膚とした。

8. テープストリッピング処理による角層バリア能の調整

角層バリア能を調整するため、テープストリッピング回数を 5, 10, 11, 13, 15, 20 回のいずれかで処理した。

9. TL 軟膏の希釈

0.1% TL 軟膏および流動パラフィンそれぞれを、目的希釈濃度に合わせて、バイアルに量りとり、攪拌子で 24 時間攪拌した。希釈したのち、軟膏中の TL 含量を測定した。すなわち、100 mL のメスフラスコに希釈軟膏を 100 mg 量りとり、クロロホルム 2 mL を添加し、軟膏を完全に溶解させた。その後、メタノールで 100 mL になるようメスアップして、軟膏基剤を析出させた。その上清を 1.5 mL マイクロチューブに分取して、遠心分離した (25°C, 14,000 rpm, 5 min)。希釈濃度に応じて、その上清をメタノールで希釈後、内標準溶液を上清に対して 2 倍量加えた。遠心分離後の上清を LC-MS/MS にて測定し、TL の軟膏中 TL 含量を確認した。

10. TL 希釈軟膏の適用方法

TL 希釈軟膏 (軟膏中 TL 濃度: 0.004, 0.003 $w/w\%$) は、粘度の低下が著しかったため、塗布面積以外への適用軟膏の展延を防ぐ目的で、適用面積と同じ面積の滅菌ガーゼを用いた。すなわち、滅菌ガーゼで適用部位を被覆し、その上から希釈軟膏を塗布した。軟膏塗布後は、同様にポリエチレン製フィルムで被覆した後、その周辺を粘着テープで固定した。

11. 等張リン酸塩緩衝液 (PBS) pH7.4 の調製

Table S3 に示した組成の水溶液 A, B の 2 : 3 の混合液を調製し、超音波洗浄機 (ASU-3D, AZ ONE Co., Ltd, Osaka, Japan) で超音波処理して脱気した。

Table S3 Composition of phosphate-buffered saline.

Solution A	KH ₂ PO ₄	0.03 M
	NaCl	0.11 M
Solution B	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.03 M
	NaCl	0.1 M

12. MD プローブを用いた皮膚末梢血管における血管収縮の誘導

MD プローブ (透析膜 : 再生ミックスセルローズ、分子量カットオフ値 : 50 kDa) を 21G の注射針をガードに用いて、ヘアレスラット皮下に挿入し、注射針を取り除くことでプローブを皮下に留置させた。プローブ挿入に伴う侵襲の影響を緩和させるため、プローブ内に pH7.4 の PBS を 1 時間灌流させた (灌流速度 1.0 μ L/min)。その後、灌流液を血管収縮誘導の目的でアドレナリンが 500 μ g/mL で溶解した PBS に変えて、溶液置換 1 時間後から *in vivo* 経皮吸収試験を開始し、試験終了まで灌流させた。

13. アドレナリン混合軟膏の調整

アドレナリンと TL 軟膏をガラスシャーレ上に測りとりスパチュラを用いて混和した (軟膏中アドレナリン濃度 : 0.25, 0.50 ^w/_w%)。混合軟膏は、*in vivo* 経皮吸収試験の前日に調製し、試験に供した。

第 2 章

1. 試薬

試薬及び溶媒は市販の特級品を購入し、さらなる精製を行わずにそのまま使用した。

2. *In vivo* ヘアレスラット皮膚における TL 経皮吸収試験

実験室内環境を、 $25.5 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 40-60% にコントロールした。雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht 系、8-10 週齢) を 5% イソフルランの吸入により麻酔導入し、その後、ウレタン溶液 (カルバミド酸エチル 1.5 g/kg) の腹腔内投与により麻酔した。背部皮膚の毛を、電気シェーバーにより除毛した。試験に供した皮膚は、角層障害皮膚および角層除去急性炎症皮膚とした。それぞれの作成方法は第 1 章と同様とした。TL 軟膏剤の塗布量は、 5.0 mg/cm^2 とし、実験操作の利便性を考えて密封塗布法により背部に投与とした。適用した軟膏は、第 1 章同様な方法で、流動パラフィンにて希釈したものを用いた (軟膏中 TL 濃度 0.004, 0.003^{w/w}%)。軟膏の密封塗布後、頸静脈よりヘパリンで前処理した注射筒を用いて経時的に 100 μL の採血を行った。

3. 摘出皮膚中 TL 量の測定

TL 軟膏の皮膚適用後 15 分および 90 分において、ウレタン溶液の追加投与 (500 μL , *i.p.*) 後、心臓からの灌流脱血を行い、軟膏適用部位となった背部皮膚を医療用剪刀にて摘出した。摘出皮膚の重量を測定した後、皮膚を施術用ハサミで細断し、5 mL のメタノール溶媒中に入れ、24 時間静置させた。抽出液を 1.5 mL マイクロチューブに測り取り、遠心分離機 (13,200 rpm, r.t., 15 min) に掛けた。その上清を 1.5 mL マイクロチューブに測り取り、内標準溶液 (Asc 10 ng/mL) 1 対 1 の容積比で混和させたのち、LC-MS/MS で測定した。

4. LC-MS/MS 測定に向けた血液サンプル処理 (溶血・除タンパク・濃縮処理)

第 1 章 5. と同様の方法で調製した。

5. LC-MS/MS によるサンプル溶液中の TL 濃度の測定

第 1 章 6. と同様の方法でサンプル溶液中の TL 濃度を LC-MS/MS で測定した。

第 3 章

1. 試薬

アトピー性皮膚炎誘発ダニ抗原含有軟膏ビオスタ[®]AD およびドデシル硫酸 Na (SDS) は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。

2. 動物 (NC/Nga マウス)

すべての動物実験は、城西大学実験動物規定に沿って計画し、全学実験動物管理委員会の承認を得て実施した(承認番号: H27044 -April 8, 2015)。雌性 NC/Nga マウス (8-10 週齢、体重 20-25 g) は、三共ラボ (埼玉) から購入した。マウスは、室内環境がコントロールされ、自由摂食下、12 時間の明暗周期で、実験に使用されるまで適切に飼育された。

3. アトピー性皮膚炎誘発プロトコール

—初回誘発方法—

- 1) NC/Nga マウス(日本チャールスリバー社製、雌性、10 週齢以降)をイソフルラン吸入麻酔下、背部および耳介部をバリカンで毛刈りした後、除毛剤を適量塗布し除毛した。
- 2) 除毛剤をふき取った後、ビオスタ[®]AD 100 mg を背部および耳介部に均一に塗布した。
- 3) 塗布後、マウスを飼育ケージに戻すした。

—2 回目以降誘発方法—

- 1) 毛が生えてきたことが確認された場合には必ず、バリカンおよび電気シェーバーで剃毛した。
- 2) 4^w/v% SDS 水溶液 150 μ L をマイクロピペットで背部および耳介部に滴下しながら、均一に塗布した。
- 3) ドライヤー(冷風)である程度乾燥させた。
- 4) マウスを飼育ケージに戻してから 2 時間放置し、自然乾燥させた。
- 5) ビオスタ[®]AD 100 mg を背部および耳介部に均一に塗布した。
- 6) 塗布後、マウスを飼育ケージに戻した。

※全ての処理は 1 週間に 2 回のペースで行った。3 週間、計 6 回の処理でアトピー性皮膚炎を誘発させた。

ダニ抗原塗布開始 17 日目に 6 回目の最終塗布を行った。21 日目もしくは 29 日目にスコアリングを行い、実験に供した。

4. PBS pH7.4 の調製

第 1 章 11. と同様の方法で調製した。

5. *In vivo* アトピー性皮膚炎モデルマウス皮膚における TL 経皮吸収試験

実験室内環境を、 $25.5 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 40-60% にコントロールした。雌性 NC/Nga マウス (8-10 週齢) を 5% イソフルランの吸入により麻酔導入し、その後、2.0-2.5% イソフルランの吸入により麻酔を維持した。TL 軟膏剤の塗布量は、8.0 mg/body とし、単純塗布法により背部に投与とした。軟膏の塗布 2 時間後、施術用ハサミで断頭し、凝血防止のためにヘパリンで前処理したロートを介して全血を採取した。

6. 0.1% TL 軟膏の希釈

マウス背部皮膚の TEWL を測定した後、(4) 式により希釈倍率を算出し、流動パラフィンにて希釈した。軟膏壺に 0.1% TL 軟膏および流動パラフィンを量りとり、 37°C の恒温槽で 10 分間インキュベートした後、軟膏練太郎 NR-50 (THINKY Co., Ltd, Japan) で 5 分間混和した (公転, 2000 rpm; 自転, 800 rpm)。その後、室温にて静置した。本検討での希釈では、軟膏の塗布後、塗布部位に保持される十分な粘度であったため、0.1% TL 軟膏と同様に単純塗布とした。

6. アドレナリン混合軟膏の調製

アドレナリンと TL 軟膏をガラスシャーレ上に測りとり、スパチュラを用いて混和した (軟膏中アドレナリン濃度: 0.25, 0.50^w/_w%)。混合軟膏は、*in vivo* 経皮吸収試験の当日に調製し、試験に供した。

7. LC-MS/MS 測定に向けた血液サンプル処理 (溶血・除タンパク・濃縮処理)

血液 300 μL に、溶血の目的で 0.1M の硫酸亜鉛溶液とメタノールを 3 対 7 で混和した溶液 450 μL を添加し、ボルテックスミキサーにて 10 秒間激しく攪拌した。さらに、攪拌後のサンプルに Asc 含有 (10 ng/mL) アセトニトリル溶液 750 μL を添加し、ボルテックスミキサーで 30 秒間激しく攪拌し、10 分間室温で静置させた。サンプルを遠心分離 (25°C , 14,000 rpm, 10 min) した後の上清 1.3mL を測定日まで -80°C で保存した。測定日、解凍後のサンプルを遠心濃縮装置 SpeedVac[®]にて濃縮 (45°C , 800 rpm, 4h, 5.1 Torr) した。乾燥固化したサンプルに移動溶液を

70 μL 添加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間激しく攪拌した後に、遠心分離 (25°C, 14,000 rpm, 5 min) し、その上清 50 μL を LC-MS/MS にて測定した。

8. LC-MS/MS によるサンプル溶液中の TL 濃度の測定

第 1 章 6. と同様の方法でサンプル溶液中の TL 濃度を LC-MS/MS で測定した。

統計処理

データの正規性の検定は、D'Agostino-Pearson 検定により、有意水準 $P < 0.05$ とした。また、標本数が少なく上記の検定で結果が得られない場合は、Kolmogorov-Smirnov 検定を行い、有意水準 $P < 0.05$ とした。

単回帰および重回帰分析における回帰係数は、 t 検定により $P < 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001$ を有意とした。重回帰式の有意性は、 F 検定により、 $P < 0.05, 0.0001$ を有意とした。

対応のない 2 群群間の平均の比較は、正規分布かつ等分散である場合、Student の t 検定を行った。正規分布であり、等分散でない場合、Welch の t 検定を行った。正規分布でない場合、Man-Whitney の U 検定を行った。

対応のない 1 要因で分類される 3 群以上の比較検定は、正規分布であれば、一元配置分散分析および等分散性の検定を行った。等分散である全群間での比較は、Tukey-Kramer 法により多重比較を行った。対照群との比較は、Dunnett 法により多重比較を行った。正規分布で対応がない群の比較では、Kruskal-Wallis 検定を行った後に、Dunn 法により対照群との多重比較を行った。

対応のない 2 要因で分類される 3 群以上の比較検定は、二元配置分散分析の後、全群間で Bonferroni 法により多重比較を行った。対照群との比較は、Dunnett 法により多重比較を行った。

2 群間比較および多重比較における有意水準は、 $P < 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0001$ とした。なお、すべての検定は、両側検定とした。

単回帰および重回帰分析に関わる検定は、エクセル統計 2012 (Social Survey Research Information Co., Ltd., 東京) を用いた。その他、すべての検定は、Graphpad prism6 (GraphPad Software. Inc., USA) を用いた。

引用文献

- 1 Thomas K, Charman C, Nankervis H, *et al.* Atopic Eczema. In: *Evidence-Based Dermatology*. Oxford, UK, John Wiley & Sons, Ltd, 2014; 136–68.
- 2 Furue M, Chiba T, Takeuchi S. Current status of atopic dermatitis in Japan. *Asia Pac. Allergy*, 2011; 1:64–72.
- 3 Williams H, Robertson C, Stewart A, *et al.* Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999; 103:125–38.
- 4 Odhiambo JA, Williams HC, Clayton TO, *et al.* Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009; 124:1251–8 e23.
- 5 Simon D, Vassina E, Yousefi S, *et al.* Reduced dermal infiltration of cytokine-expressing inflammatory cells in atopic dermatitis after short-term topical tacrolimus treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004; 114:887–95.
- 6 Schuller E, Oppel T, Bornhövd E, *et al.* Tacrolimus ointment causes inflammatory dendritic epidermal cell depletion but no Langerhans cell apoptosis in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004; 114:137–43.
- 7 Panhans-Groß A, Novak N, Kraft S, Bieber T. Human epidermal Langerhans' cells are targets for the immunosuppressive macrolide tacrolimus (FK506). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001; 107:345–52.
- 8 Ashcroft DM, Dimmock P, Garside R, *et al.* Efficacy and tolerability of topical pimecrolimus and tacrolimus in the treatment of atopic dermatitis: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*, 2005; 330:516.
- 9 El-Batawy MMY, Bosseila MA-W, Mashaly HM, Hafez VSGA. Topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis: A systematic review and meta-analysis. *J. Dermatol. Sci.*, 2009; 54:76–87.

- 10 Garside R, Stein K, Castelnovo E, *et al.* The effectiveness and cost-effectiveness of pimecrolimus and tacrolimus for atopic eczema: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.*, 2005; 9:iii, xi – xiii, 1–230.
- 11 Reitamo S, Van Leent EJM, Ho V, *et al.* Efficacy and safety of tacrolimus ointment compared with that of hydrocortisone acetate ointment in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002; 109:539–46.
- 12 Reitamo S, Rustin M, Ruzicka T, *et al.* Efficacy and safety of tacrolimus ointment compared with that of hydrocortisone butyrate ointment in adult patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002; 109:547–55.
- 13 Rustin MH a. The safety of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis: a review. *Br. J. Dermatol.*, 2007; 157:861–73.
- 14 Kang S, Lucky AW, Pariser D, *et al.* Long-term safety and efficacy of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in children. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2001; 44:S58–64.
- 15 Soter NA, Fleischer AB, Webster GF, *et al.* Tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in adult patients: part II, safety. *J Am. Acad. Dermatol.*, 2001; 44:S39–46.
- 16 Reitamo S, Rissanen J, Remitz a, *et al.* Tacrolimus ointment does not affect collagen synthesis: results of a single-center randomized trial. *J. Invest. Dermatol.*, 1998; 111:396–8.
- 17 アステラス製薬株式会社. プロトピック®軟膏 0.1%, 医薬品インタビューフォーム., 2014.
- 18 Hui R, Lide W, Chan J, *et al.* Association between exposure to topical tacrolimus or pimecrolimus and cancers. *Ann. Pharmacother.*, 2009; 43:1956–63.
- 19 Schneeweiss S, Doherty M, Zhu S, *et al.* Topical treatments with pimecrolimus, tacrolimus and medium- to high-potency corticosteroids, and risk of lymphoma. *Dermatology*, 2009; 219:7–21.
- 20 Arellano FM, Arana A, Wentworth CE, *et al.* Lymphoma among

- patients with atopic dermatitis and/or treated with topical immunosuppressants in the United Kingdom. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009; 123:1111–6, 116.e1–13.
- 21 Arellano F, Wentworth C, Arana A, *et al.* Risk of lymphoma following exposure to calcineurin inhibitors and topical steroids in patients with atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 2007; 127:808–16.
 - 22 Ruzicka T, Bieber T, Schöpf E, *et al.* A short-term trial of tacrolimus ointment for atopic dermatitis. European Tacrolimus Multicenter Atopic Dermatitis Study Group. *N. Engl. J. Med.*, 1997; 337:816–21.
 - 23 Paller A, Eichenfield LF, Leung DYM, *et al.* A 12-week study of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in pediatric patients. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2001; 44:S47–57.
 - 24 Rubins A, Gutmane R, Valdmane N, *et al.* Pharmacokinetics of 0.1% tacrolimus ointment after first and repeated application to adults with moderate to severe atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 2005; 125:68–71.
 - 25 Undre N a., Moloney FJ, Ahmadi S, *et al.* Skin and systemic pharmacokinetics of tacrolimus following topical application of tacrolimus ointment in adults with moderate to severe atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.*, 2009; 160:665–9.
 - 26 Reitamo S, Mandelin J, Rubins A, *et al.* The pharmacokinetics of tacrolimus after first and repeated dosing with 0.03% ointment in infants with atopic dermatitis. *Int. J. Dermatol.*, 2009; 48:348–55.
 - 27 Mori T, Ishida K, Mukumoto S, *et al.* Comparison of skin barrier function and sensory nerve electric current perception threshold between IgE-high extrinsic and IgE-normal intrinsic types of atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.*, 2010; 162:83–90.
 - 28 Tokura Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.*, 2010; 58:1–7.
 - 29 Bos J, Meinardi M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.*, 2000; 9:165–9.
 - 30 Tsai JC, Hung PL, Sheu HM. Molecular weight dependence of

- polyethylene glycol penetration across acetone-disrupted permeability barrier. *Arch. Dermatol. Res.*, 2001; 293:302–7.
- 31 Jakasa I, Verberk M, Esposito M, *et al.* Altered penetration of polyethylene glycols into uninvolved skin of atopic dermatitis patients. *J. Invest. Dermatol.*, 2007; 127:129–34.
 - 32 Meingassner JG, Aschauer H, Stuetz A, Billich A. Pimecrolimus permeates less than tacrolimus through normal, inflamed, or corticosteroid-pretreated skin. *Exp. Dermatol.*, 2005; 14:752–7.
 - 33 Seki T, Hosoya O, Yamazaki T, *et al.* A rabbit ear flap perfusion experiment to evaluate the percutaneous absorption of drugs. *Int. J. Pharm.*, 2004; 276:29–40.
 - 34 Oshima S, Suzuki C, Yajima R, *et al.* The Use of an Artificial Skin Model to Study Transdermal Absorption of Drugs in Inflamed Skin. *Biol. Pharm. Bull.*, 2012; 35:203–9.
 - 35 Bystryń J, Hyman C. Skin blood flow in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 1969; 52:189–92.
 - 36 Nardo A, Wertz P, Giannetti A, Seidenari S. Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta. Derm. Venereol.*, 1998; 78:27–30.
 - 37 Jensen J, Fölster-Holst R, Baranowsky A, *et al.* Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 2004; 122:1423–31.
 - 38 Stäcker M, Heese A, Hoffmann K, *et al.* Quantification of vascular dysregulation in atopic dermatitis using laser Doppler perfusion imaging. *Ski. Res. Technol.*, 1998; 4:9–13.
 - 39 Laudańska H, Reduta T, Szmitkowska D. Evaluation of skin barrier function in allergic contact dermatitis and atopic dermatitis using method of the continuous TEWL measurement. *Rocz. Akad. Med. w Białymstoku*, 2003; 48:123–7.
 - 40 Hadgraft J, Lane ME. Transepidermal water loss and skin site: A hypothesis. *Int. J. Pharm.*, 2009; 373:1–3.

- 41 Newton DJ, McLeod G a, Khan F, Belch JFF. Vasoactive characteristics of bupivacaine and levobupivacaine with and without adjuvant epinephrine in peripheral human skin. *Br. J. Anaesth.*, 2005; 94:662–7.
- 42 Petersen LJ. Direct comparison of laser Doppler flowmetry and laser Doppler imaging for assessment of experimentally-induced inflammation in human skin. *Inflamm. Res.*, 2013; 62:1073–8.
- 43 田中誠, 二木伸子, 高橋修哉, *et al.* TS□410の抗炎症作用 第2報 軟膏塗布による作用. *薬理と臨床*, 1995; 5:1599–607.
- 44 Asztely A, Havel G, Ekstrom J. Vascular protein leakage in the rat parotid gland elicited by reflex stimulation, parasympathetic nerve stimulation and administration of neuropeptides. *Regul. Pept.*, 1998; 77:113–20.
- 45 Huggenberger R, Siddiqui SS, Brander D, *et al.* An important role of lymphatic vessel activation in limiting acute inflammation. *Blood*, 2011; 117:4667–78.
- 46 Addor F, Takaoka R, Rivitti E, Aoki V. Atopic dermatitis: Correlation between non-damaged skin barrier function and disease activity. *Int. J. Dermatol.*, 2012; 51:672–6.
- 47 Jui-Chen T, Weiner ND, Flynn GL, Ferry J. Properties of adhesive tapes used for stratum corneum stripping. *Int. J. Pharm.*, 1991; 72:227–31.
- 48 Harper J, Smith C, Rubins A, *et al.* A multicenter study of the pharmacokinetics of tacrolimus ointment after first and repeated application to children with atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 2005; 124:695–9.
- 49 Sommer A, Lucassen GW, Houben AJH., Neumann MH. Vasoconstrictive effect of topical applied corticosteroids measured by laser doppler imaging and reflectance spectroscopy. *Microvasc. Res.*, 2003; 65:152–9.
- 50 Groth L, Jørgensen A, Serup J. Cutaneous microdialysis in the rat: Insertion trauma and effect of anaesthesia studied by laser Doppler

- perfusion imaging and histamine release. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 1998; 11:125–32.
- 51 Mathy F-X, Denet A-R, Vroman B, *et al.* In vivo Tolerance Assessment of Skin after Insertion of Subcutaneous and Cutaneous Microdialysis Probes in the Rat. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 2003; 16:18–27.
 - 52 Benfeldt E. Skin and Transdermal Drug Delivery. In: *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series.*, 2013; 127–42.
 - 53 Rodrigues LM, Pinto PC, Magro JM, *et al.* Exploring the influence of skin perfusion on transepidermal water loss. *Skin Res. Technol.*, 2004; 10:257–62.
 - 54 Saeki H, Furue M, Furukawa F, *et al.* Guidelines for management of atopic dermatitis. *J. Dermatol.*, 2009; 36:563–77.
 - 55 Weiss HM, Fresneau M, Moenius T, *et al.* Binding of pimecrolimus and tacrolimus to skin and plasma proteins: Implications for systemic exposure after topical application. *Drug Metab. Dispos.*, 2008; 36:1812–8.
 - 56 Kuribayashi T, Tomizawa M, Seita T, *et al.* Relationship between production of acute-phase proteins and strength of inflammatory stimulation in rats. *Lab. Anim.*, 2011; 45:215–8.
 - 57 Sasakawa T, Higashi Y, Sakuma S, *et al.* Topical Application of FK506 (Tacrolimus) Ointment Inhibits Mite Antigen-Induced Dermatitis by Local Action in NC/Nga Mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2004; 133:55–63.
 - 58 Magnusson BM, Anissimov YG, Cross SE, Roberts MS. Molecular size as the main determinant of solute maximum flux across the skin. *J. Invest. Dermatol.*, 2004; 122:993–9.
 - 59 Müller B, Kasper M, Surber C, Imanidis G. Permeation, metabolism and site of action concentration of nicotinic acid derivatives in human skin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2003; 20:181–95.
 - 60 Homey B, Assmann T, Vohr HW, *et al.* Topical FK506 suppresses cytokine and costimulatory molecule expression in epidermal and

- local draining lymph node cells during primary skin immune responses. *J. Immunol.*, 1998; 160:5331–40.
- 61 Yamamoto M, Haruna T, Yasui K, *et al.* A novel atopic dermatitis model induced by topical application with dermatophagoides farinae extract in NC/Nga mice. *Allergol. Int.*, 2007; 56:139–48.
 - 62 Oshio T, Sasaki Y, Funakoshi-Tago M, *et al.* Dermatophagoides farinae extract induces severe atopic dermatitis in NC/Nga mice, which is effectively suppressed by the administration of tacrolimus ointment. *Int. Immunopharmacol.*, 2009; 9:403–11.
 - 63 Kim J, Jeong M, Park M, *et al.* Time-dependent progression from the acute to chronic phases in atopic dermatitis induced by epicutaneous allergen stimulation in NC/Nga mice. *Exp. Dermatol.*, 2014; 23:53–7.
 - 64 Kim J-Y, Jeong MS, Park MK, *et al.* Time-dependent progression from the acute to chronic phases in atopic dermatitis induced by epicutaneous allergen stimulation in NC/Nga mice. *Exp. Dermatol.*, 2014; 23: 53–7.
 - 65 Zahir H, Nand R a, Brown KF, *et al.* Validation of methods to study the distribution and protein binding of tacrolimus in human blood. *J Pharmacol. Toxicol. Methods*, 2001; 46:27–35.